



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Εφαρμογές μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική- Διαγνωστικοί δείκτες»

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ
ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ
ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



**ΚΡΕΑΤΣΟΥΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος**

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ
ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ
ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

**ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AN ENCAPSULATED
POLYPHENOLIC EXTRACT FROM OLIVE MILL WASTEWATER WITH
MOLECULAR AND CELLULAR METHODS**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

Στους γονείς μου,

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία και την υποστήριξη που μου παρείχε, μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για τη συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας, καθώς και τον κύριο Κωνσταντίνο Πετρωτό για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης και φυσικά για την παροχή των δειγμάτων που μελέτησα μιας και χωρίς αυτά δε θα μπορούσαν να διεξαχθούν τα πειράματα.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Θάλεια Κερασιώτη για τη βοήθειά της.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου, στους οποίους και αφιερώνω αυτήν την εργασία, για την αγάπη τους και την αμέριστη ψυχολογική και οικονομική τους στήριξη κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών μου.

Περιεχόμενα:

Περίληψη	16
Abstract	18
Περιεχόμενα	6
Περιεχόμενα Εικόνων	9
Περιεχόμενα Πινάκων	11
Περιεχόμενα Γραφημάτων	11

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

1.1.1. Γενικά	20
1.1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	21
1.1.3. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	22
1.1.4. Οξειδωτικό stress	24

1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.2.1. Γενικά	25
1.2.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών	25
1.2.2.1. Φλαβονοειδή	26
1.2.2.2. Μη Φλαβονοειδή	28
1.2.3. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών	30
1.2.4. Τρόπος δράσης πολυφαινολών	31

1.3. ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ

1.3.1. Γενικά	33
1.3.2. Τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου	34

1.3.3. Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	37
1.3.4. Πολυφαινολικό περιεχόμενο των ΥΑΕ	37
1.3.5. Μέθοδοι ανάκτησης των φαινολικών ενώσεων από τα ΥΑΕ	39
1.3.6 Ενθυλάκωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος που ανακτήθηκε από τα ΥΑΕ	41

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ	42
-------------	----

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	43
3.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	44
3.1.3. Εκχυλίσματα	45

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ABTS^{•+} scavenging assay

3.2.1.1. Αρχή μεθόδου	46
3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία	47
3.2.1.3. Στατιστική ανάλυση	49

3.2.2. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων

θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

3.2.2.1. Γενικά	49
3.2.2.2. Αρχή μεθόδου	51
3.2.2.3. Πειραματική διαδικασία	52
3.2.2.4. Στατιστική ανάλυση	54

3.2.3. Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926	55
3.2.4. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας δειγμάτων με τη μέθοδο XTT	
3.2.4.1. Αρχή μεθόδου	56
3.2.4.2. Πειραματική διαδικασία	56
3.2.4.3. Στατιστική ανάλυση	58
3.2.5. Κυτταρομετρία ροής	
3.2.5.1. Αρχή μεθόδου	58
3.2.5.2. Πειραματική διαδικασία	61
<u>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	
4.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	63
4.2. Αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων έναντι της επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	72
4.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ABTS ^{•+} και ROO [•]	82
4.4. Αποτελέσματα της μεθόδου XTT	83
4.5. Αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής	84
4.6. Αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής	89
<u>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	95
<u>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	98

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο που υπάρχει στην εξωτερική της στιβάδα.	20
Εικόνα 2: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών.	21
Εικόνα 3: Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών.	23
Εικόνα 4 : Η κατάσταση ανισορροπίας ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού	24
Εικόνα 5: Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών.	28
Εικόνα 6: α) χημική δομή φερουλικού οξέος (ανήκει στα υδροξυκιναμικά οξέα), β) ελλαγικό οξύ (ανήκει στα υδροξυβενζοϊκά οξέα), γ) ματαιρεσινόλη (λινγάνιο) και δ) ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)	29
Εικόνα 7: Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.	34
Εικόνα 8: Προσεγγιστικός υπολογισμός παραγωγής κατσίγαρου ανά 1000 kg ελαιοκάρπου.	35
Εικόνα 9: Ορισμένες από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον Κατσίγαρο.	38
Εικόνα 10: Αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου σε διάφορους βιοδείκτες.	40
Εικόνα 11: Παραγωγή της ρίζας του ABTS, μέσω δράσης της περοξειδάσης παρουσία H_2O_2	46
Εικόνα 12: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα του ABTS.	47
Εικόνα 13: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA και πως αυτές εμφανίζονται καθώς τρέχουν σε πήκτωμα αγαρόζης.	50

Εικόνα 14: Η αντίδραση θερμόλυσης του AAPH κατά την οποία παράγεται άζωτο και δύο ρίζες αλκυλίου, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με το οξυγόνο, παράγοντας τις ρίζες περοξυλίου ROO [•] .	51
Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.	53
Εικόνα 16: Στάδια απομάκρυνσης των χρωματισμένων ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση.	54
Εικόνα 17: Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech.	54
Εικόνα 18: Καλλιέργεια κυττάρων EA.hy926 σε οπτικό μικροσκόπιο.	55
Εικόνα 19: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.	56
Εικόνα 20: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer και καλυπτρίδες β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του	57
Εικόνα 21: Κυτταρόμετρο ροής.	60
Εικόνα 22: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.	73
Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων γλουταθειόνης (κάτω σειρά) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τη χορήγηση του δείγματος «πρωτεΐνη 2».	85
Εικόνα 24: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων ελευθέρων ριζών (κάτω σειρά) μετά από χρώση με DCFDA υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης του δείγματος «μαλτοδεξτρίνη 16».	89

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Κατάταξη αντιοξειδωτικών παραγόντων.	23
Πίνακας 2: Μέγιστες και ελάχιστες τιμές των σημαντικότερων παραμέτρων ρύπανσης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων.	36
Πίνακας 3: Μέθοδοι διαχείρισης ΥΑΕ.	37
Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας του πλήθους των δειγμάτων που εξετάσθηκαν και των συνθηκών ενθυλάκωσής τους.	45
Πίνακας 5: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων.	48
Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων χωρίς την παρουσία του ενζύμου.	48
Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων.	52

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 1.	63
Γράφημα 2: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 2.	64
Γράφημα 3: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 3.	64
Γράφημα 4: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 4.	65
Γράφημα 5: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 5.	65
Γράφημα 6: H % δέσμευση της ρίζας ABTS ^{•+} από το δείγμα 6.	66

Γράφημα 7: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 7.</i>	66
Γράφημα 8: <i>Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ των ενθυλακωμένων σε πρωτεΐνη δειγμάτων.</i>	67
Γράφημα 9: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 8.</i>	67
Γράφημα 10: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 10.</i>	68
Γράφημα 11: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 11.</i>	68
Γράφημα 12: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 15.</i>	69
Γράφημα 13: <i>H % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 16.</i>	69
Γράφημα 14: <i>Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ των ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη δειγμάτων.</i>	70
Γράφημα 15: <i>Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ του συνόλου των ενθυλακωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο ABTS.</i>	70
Γράφημα 16: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 1.</i>	74
Γράφημα 17: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 2.</i>	74
Γράφημα 18: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 3.</i>	75
Γράφημα 19: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 4.</i>	75
Γράφημα 20: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 5.</i>	76
Γράφημα 21: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 6.</i>	76
Γράφημα 22: <i>H % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 7.</i>	77

Γράφημα 23: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} των ενθυλακωμένων σε πρωτεΐνη δειγμάτων.	77
Γράφημα 24: Η % δέσμευση των ριζών ROO^{\bullet} από το δείγμα 8.	78
Γράφημα 25: Η % δέσμευση των ριζών ROO^{\bullet} από το δείγμα 10.	78
Γράφημα 26: Η % δέσμευση των ριζών ROO^{\bullet} από το δείγμα 11.	79
Γράφημα 27: Η % δέσμευση των ριζών ROO^{\bullet} από το δείγμα 15.	79
Γράφημα 28: Η % δέσμευση των ριζών ROO^{\bullet} από το δείγμα 16.	80
Γράφημα 29: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} των ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη δειγμάτων.	80
Γράφημα 30: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} του συνόλου των ενθυλακωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο AAPH.	81
Γράφημα 31: Απεικόνιση των τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους.	82
Γράφημα 32: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης της κυτταρικής σειράς EA.hy926 από το δείγμα 2, το οποίο είναι ενθυλακωμένο σε πρωτεΐνη.	83
Γράφημα 33: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης της κυτταρικής σειράς EA.hy926 από το δείγμα 16, το οποίο είναι ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη.	83
Γράφημα 34: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας Ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- απουσία t-BOOH.	85
Γράφημα 35: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p<0,05$)	85

Γράφημα 36: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- παρουσία t-BOOH._____86

Γράφημα 37: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p<0,05$)_____86

Γράφημα 38: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- Απουσία t-BOOH._____87

Γράφημα 39: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p<0,05$)_____87

Γράφημα 40: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- παρουσία t-BOOH._____88

Γράφημα 41: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p<0,05$)_____88

Γράφημα 42: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- Απουσία t-BuOOH._____91

Γράφημα 43: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p<0,05$)_____91

Γράφημα 44: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- παρουσία t-BOOH._____92

Γράφημα 45: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (*control*), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα *t-BHP* (0,3μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το *control t-BHP* ($p<0,05$)_____92

Γράφημα 46: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- Απουσία *t-BOOH*._____93

Γράφημα 47: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (*control*) και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες._____93

Γράφημα 48: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- παρουσία *t-BOOH*._____94

Γράφημα 49: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (*control*), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα *t-BHP* (0,3μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το *control t-BHP* ($p<0,05$)_____94

Περίληψη

Η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση λαχανικών, οσπρίων, φρούτων, ξηρών καρπών και δημητριακών, καθώς και από το ελαιόλαδο, που είναι το κύριο λίπος που χρησιμοποιείται. Η κατανάλωση ελαιολάδου συνδέεται με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, νευρολογικών διαταραχών και καρκίνου. Πρόσφατα οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου έχουν αποδοθεί σε επιμέρους συστατικά του, τις φυτικές πολυφαινόλες. Αυτές οι ενώσεις συναντώνται επίσης και στα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου και που αποτελούν σημαντικό ρύπο.

Η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από τη διατήρηση της σταθερότητας και της βιοδραστικότητάς τους, καθώς και από την ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Ωστόσο, η δυσάρεστη γεύση των περισσότερων φαινολικών συμπλόκων περιορίζει την πρακτική εφαρμογή τους. Έτσι, η χρησιμοποίηση ενθυλακωμένων πολυφαινολών, αντί ελεύθερων ενώσεων, αποτελεί τη λύση στα παραπάνω προβλήματα, καλύπτοντας τη δυσάρεστη γεύση, παρέχοντας ελεγχόμενη απελευθέρωση των εκχυλισμάτων μέσω της παγίδευσης τους στο φορέα και αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα τους στον οργανισμό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, το οποίο ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey protein). Έτσι, ένα πολυφαινολικό εκχύλισμα που απομονώθηκε από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη υπό 5 διαφορετικές συνθήκες καθώς και σε πρωτεΐνη whey υπό 7 διαφορετικές συνθήκες. Επομένως, ελέγχθηκαν συνολικά, 12 διαφορετικά δείγματα.

Για την *in vitro* εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τρεις μέθοδοι.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία εξουδετέρωσης της σταθερής χημικής ρίζας ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δείγματα που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται από 219±24 έως 540±38 μg/ml, ενώ τα δείγματα που ενθυλακώθηκαν σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος είχαν αντιοξειδωτική δράση με τιμές IC₅₀ από 355±14 έως 547±16 μg/ml.

Επίσης, αξιολογήθηκε η προστατευτική δράση των δειγμάτων έναντι της επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό

DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη δείγματα ανέστειλαν τη βλάβη του DNA με τιμές IC_{50} από 590 ± 65 έως 2250 ± 180 $\mu\text{g/ml}$, ενώ τα ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη δείγματα παρουσίασαν τιμές IC_{50} από 520 ± 41 έως 1580 ± 63 $\mu\text{g/ml}$.

Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα βελτίωσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926), από τα δύο ισχυρότερα δείγματα μεταξύ μαλτοδεξτρίνης (δείγμα 16) και πρωτεΐνης (δείγμα 2), αξιολογώντας τα επίπεδα ROS και της γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής. Και οι δύο δείκτες οξειδωτικού stress, εξετάστηκαν τόσο απουσία όσο και παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Διαπιστώθηκε πως και στα δύο δείγματα απουσία του οξειδωτικού παράγοντα τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν έως και 88%, ενώ παρουσία του t-BOOH τα επίπεδα γλουταθειόνης αυξήθηκαν ακόμη περισσότερο στο δείγμα της μαλτοδεξτρίνης 16 (104%), όμως το δείγμα της πρωτεΐνης 2 αν και τα αύξησε κατά 43% στα 1600 $\mu\text{g/ml}$, αυτή η αύξηση δεν ήταν μεγαλύτερη απ' ότι απουσία του t-BOOH. Όσον αφορά τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών και τα δύο εξεταζόμενα δείγματα, απουσία του οξειδωτικού παράγοντα τα μείωσαν ελάχιστα. Ωστόσο παρουσία του t-BOOH τα επίπεδα των ROS παρουσιάστηκαν περισσότερο μειωμένα και ειδικά στην περίπτωση του δείγματος της μαλτοδεξτρίνης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα δείχνουν πως το υπό εξέταση ενθυλακωμένο πολυφαινολικό εκχύλισμα που ανακτήθηκε από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και επομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής, βιολειτουργικών τροφίμων ή και ως συντηρητικό.

Abstract

The traditional Mediterranean diet is characterized by the consumption of vegetables, legumes, fruit, nuts, and cereals, as well as olive oil being the main fat in the diet. The consumption of olive oil is associated with a low incidence of cardiovascular diseases, neurological disorders, and cancer. Recently, several minor components have been related to the olive oil healthy properties, mainly plant polyphenols. We can also find these compounds at the olive mill wastewater (OMW) that are produced during the olive oil production procedure.

The effectiveness of polyphenols depends on preserving their stability and bioactivity and enhancing their bioavailability. However, the unpleasant taste of most phenolic compounds limits their practical application. Thus, the utilization of encapsulated polyphenols, instead of free compounds, can effectively overcome these problems.

The aim of the present study was the assessment of the antioxidant activity of a polyphenolic extract from olive mill wastewater that was encapsulated in maltodextrin and whey protein. So, a polyphenolic extract isolated from olive mill wastewater was encapsulated in maltodextrin under 7 different conditions as well as in whey protein under 5 different conditions. Thus, in total, 12 different samples were tested.

For the *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of the samples were used three methods in total.

First, was used the ABTS^{•+} scavenging assay. The results showed that the samples encapsulated in maltodextrin had antioxidant activity with IC₅₀ values ranging from 219±24 to 540±38 µg/ml, while the samples encapsulated in whey protein had antioxidant activity with IC₅₀ values ranging from 355±14 to 547±16 µg/ml.

Also, it was evaluated the protective activity of the samples against the induced by peroxy radicals (ROO[•]) plasmid DNA damage. The results showed that the encapsulated in maltodextrin samples protected from DNA damage with IC₅₀ values ranging from 590±65 to 2250±180 µg/ml, while the samples encapsulated in whey protein had antioxidant capacity with IC₅₀ values ranging from 520±41 to 1580±63 µg/ml.

Furthermore, it was examined the ability of the most potent maltodextrin and whey protein samples to improve the antioxidant mechanisms of endothelial cells (EA.hy926) by assessing ROS and glutathione (GSH) levels, in the absence as well as in the presence of the oxidative factor t-BOOH, using flow cytometry. It was found that both samples increased the GSH levels, while only the encapsulated in maltodextrin sample showed a trend to reduce ROS levels.

In conclusion, the results suggest that the encapsulated polyphenolic extract from the olive mill wastewater has a strong antioxidant capacity, and thus it could be used for developing food supplements, biofunctional foods or as a preservative

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

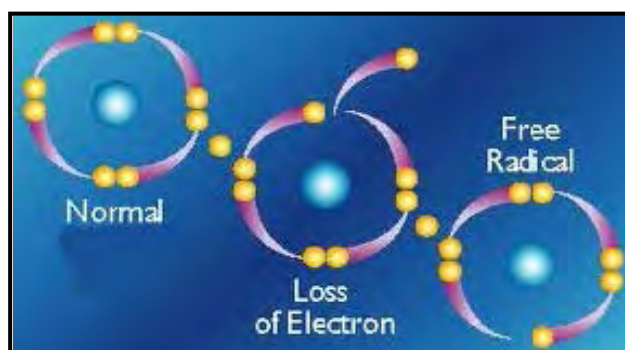
1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

1.1.1. Γενικά

Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας των ατόμων και των μορίων βρίσκονται συνήθως σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε μία καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται αντίστοιχα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, που φέρουν στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα του ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηριότητα του μορίου ή του ατόμου, γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά άτομα, προκειμένου να σχηματίσει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που θα κάνει τη δομή του σταθερότερη.

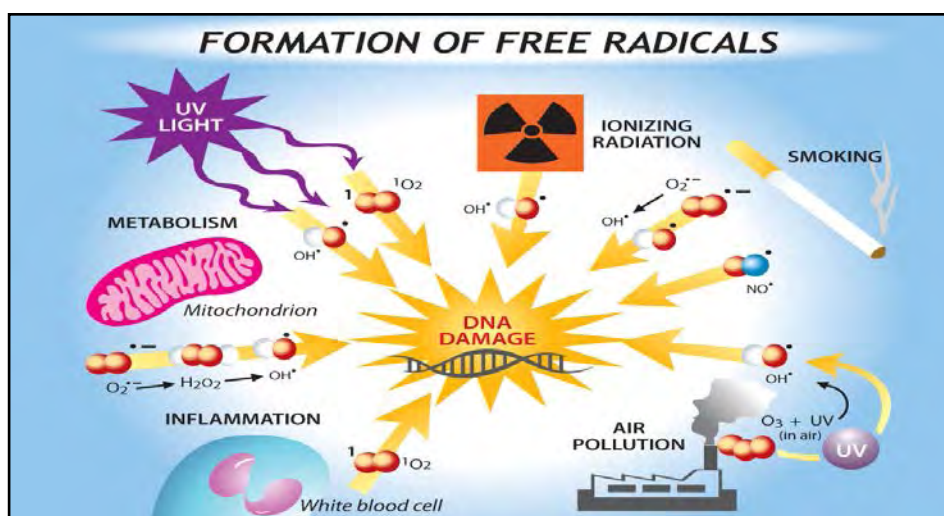
Γενικά οι ελεύθερες ρίζες οφείλουν την αστάθειά τους και τη μεγάλη τους χημική δραστηριότητα στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους (Valavanidis, 2006). Σε αυτήν τους τη μεγάλη χημική δραστηριότητα αποδίδεται και το γεγονός πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του εκάστοτε βιολογικού υποστρώματος. Σε περίπτωση που το βιολογικό υπόστρωμα είναι το DNA τότε είναι δυνατόν να προκληθούν μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν στον καρκίνο.



Εικόνα 1: Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο που υπάρχει στην εξωτερική της στιβάδα.

1.1.2 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ως παραπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια ή και κατά τη λιπιδική οξείδωση. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν οι ακτινοβολίες (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία), η φλεγμονή, το κάπνισμα και η ρυπασμένη ατμόσφαιρα. Η παρουσία των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται, προκειμένου να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παράγονται ως παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών, όπως προαναφέρθηκε.



Εικόνα 2: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες :

- Είναι ρυθμιστές της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, συμμετέχοντας στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και ενεργοποιώντας τη διαδικασία της απόπτωσης.
- Ενεργοποιούν ένζυμα και προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς.

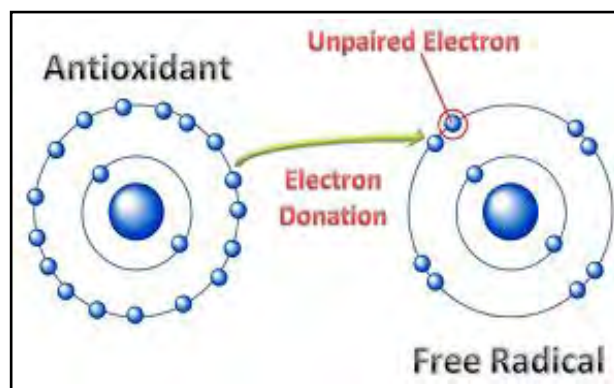
- Αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών.
- Η ρίζα NO^\bullet είναι σημαντικός ρυθμιστής της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυϊκών ινών.

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται ο όρος Reactive oxygen species (ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το O_2^\bullet , και το OH^\bullet . Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^\bullet), του υδροξυλίου (OH^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet) και του περοξυλίου (ROO^\bullet).

Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet), οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν ως κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξείδιο (NO^\bullet) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^\bullet), καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. HNO_2) (Halliwell & Gutteridge, 1998, Halliwell, 2001).

1.1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιοσδήποτε παράγοντας ο οποίος σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχετικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει, αναστέλλει ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell, 2001). Η δράση των αντιοξειδωτικών συνίσταται, είτε στην παρεμπόδιση της οξείδωσης των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε στον περιορισμό του σχηματισμού επιπλέον ελευθέρων ριζών (Scalbert et al, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά δρουν, είτε προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει εμποδίζοντας έτσι τη βλαπτική δράση τους, είτε ενεργοποιώντας τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού μας (Halliwell, 2001).



Εικόνα 3: Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση ως εξής:

- ❖ Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες
- ❖ Αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής.

ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ
✓ Ένζυμα	✓ Δεσμευτές ελευθέρων ριζών
Κυτόχρωμα C	Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Α-Τοκοφερόλη (βιταμίνη E)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Β-καροτένιο
Τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης	Λυκοπένιο
Καταλάση (CAT)	Πολυφαινόλες
✓ Μη ενζυμικά	✓ Ιχνοστοιχεία
Ουρικό οξύ	Zn
Τρανσφερίνη	Cu
Χολερυθρίνη	Mg
Γλουταθειόνη	Se
Σερουλοπλασμίνη κ.α	

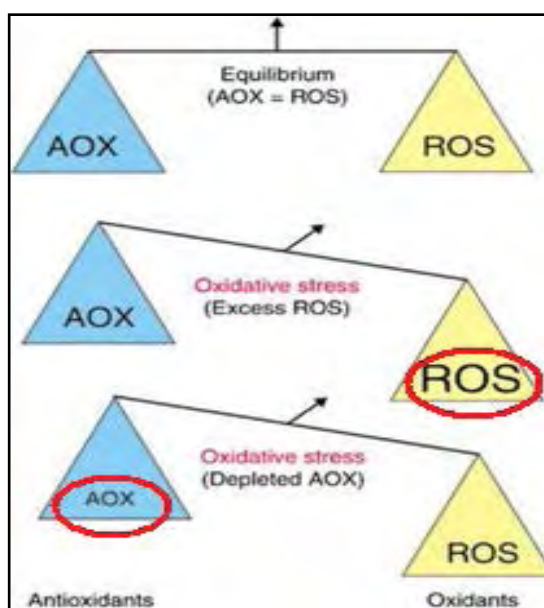
Πίνακας 1: Κατάταξη αντιοξειδωτικών παραγόντων.

1.1.4. Οξειδωτικό stress

Ο όρος οξειδωτικό stress περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού κατά την οποία υπερισχύει η παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004).

Το οξειδωτικό stress προκαλείται συνήθως από:

- Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί, είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, είτε λόγω μειωμένης πρόσληψης αντιοξειδωτικών παραγόντων μέσω της διατροφής.
- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει, είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, είτε λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή των ROS.



Εικόνα 4. Η κατάσταση ανισορροπίας ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού.

1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.2.1. Γενικά

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ, 2010). Οι πολυφαινόλες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπερϊώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν οι τροφές αυτές (Kris- Etherton P.M. et al, 2002). Τα τελευταία 60 χρόνια υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al 2005).

1.2.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Σχετικά με τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, μιας και ενώ άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες πάλι είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Οι πολυφαινόλες προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005). Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που

περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, στυλβένια και οι λιγνάνια).

1.2.2.1. Φλαβονοειδή

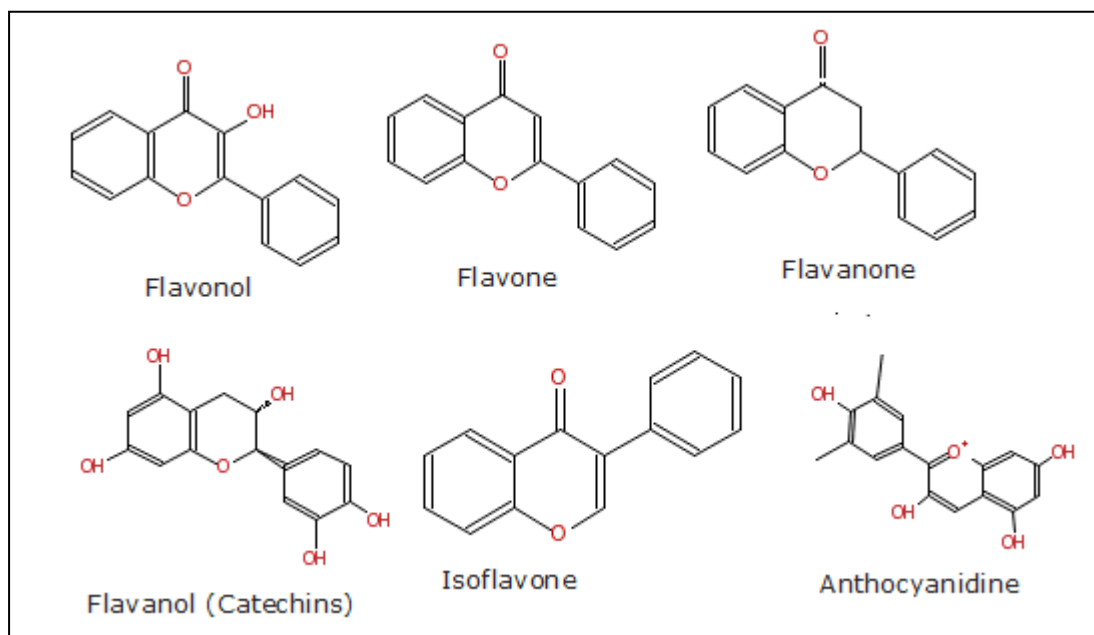
Τα φλαβονοειδή είναι η πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 4000 ενώσεις σε πολλές φυτικές πηγές. Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Επίσης δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Cheynier, 2005).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανιδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach et al., 2004).

- Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Συναντώνται στις περισσότερες τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο με σημαντικότερες πηγές τους να είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι. Συνήθως βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως O – γλυκοσίδια και συσσωρεύονται κυρίως στην επιδερμίδα και στα φύλλα του φυτού εφόσον η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al., 2004).
- Φλαβανόλες: συνιστούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών, Υπάρχουν είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, έπειτα από

κατεργασία με ισχυρά οξέα. (Crozier A, et al. 2006). Οι φλαβανόλες εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, ενώ σημαντικότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.

- Φλαβόνες: Οι κυριότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στα φρούτα και στα λαχανικά είναι γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης. Οι περισσότερες υπάρχουν ως 7 - O – γλυκοσίδια. Βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά και στα εσπεριδοειδή (σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi F, Naczsk M. 1995).
- Φλαβανόνες: βρίσκονται στις ντομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N., 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες (Manach C. et al, 2004).
- Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτοοιστρογόνου και την ικανότητα τους να μπορούν να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Συναντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης (Manach C. et al, 2004).
- Ανθοκυανιδίνες: Οι ανθοκυανιδίνες εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων τους και προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Μέσα στο φυτό είναι πολύ ανθεκτικές στο φως, το pH και σε καταστάσεις οξείδωσης. Η κυανιδίνη είναι η κύρια εκπρόσωπός τους. Συναντώνται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαιτέρως στα φρούτα (Clifford M.N., 2000).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

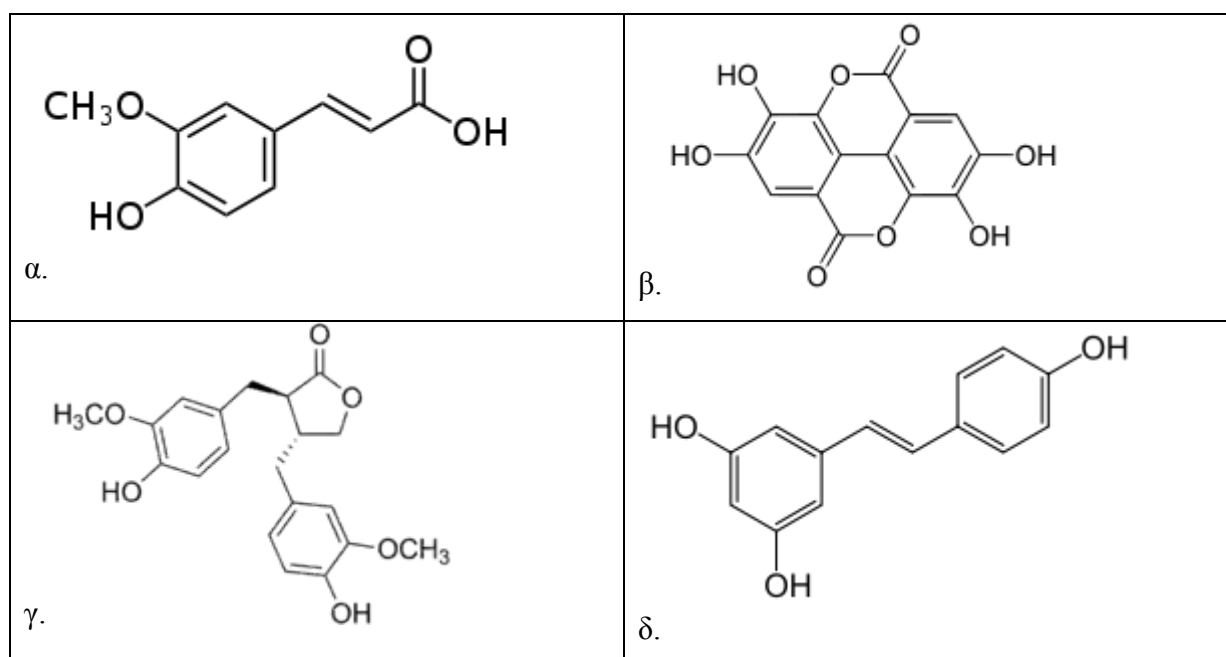
1.2.2.2. Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- ❖ Φαινολικά οξέα: Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά (C6-C3) οξέα. Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξάιρεση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες τανίνες (Clifford M.N., Scalbert A, 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά σε σύγκριση με τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουνικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006, Manach et al., 2004).
- ❖ Λιγνάνια: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένα με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκο-ισο-καϊλαρισιρεσινόλη και η

ματαιρεσινόλη, τα οποία μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε δημητριακά, φρούτα, λαχανικά και δημητριακά (Adlercreutz H., Mazur W., 1997).

- ❖ Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί (Bertelli A. et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση.



Εικόνα 6: α) χημική δομή φερουλικού οξέος (ανήκει στα υδροξυκιναμικά οξέα), β) ελλαγικό οξύ (ανήκει στα υδροξυβενζοϊκά οξέα), γ) ματαιρεσινόλη (λιγνάνιο) και δ) ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)

1.2.3. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινόλων

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Γενικά οι πολυφαινόλες:

- ✓ Θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Ακόμη, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων (Manach C., et al, 2004, Di Carlo G., et al., 1999, Harborne J.B., 1986).
- ✓ Ως αντιοξειδωτικά οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al, 2005).
- ✓ Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινόλων, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M. & Dong Z., 2006).

Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν τον ρόλο των πολυφαινόλων στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert A. et al, 2005).

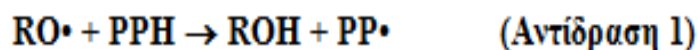
1.2.4. Τρόπος δράσης πολυφαινόλων

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών και χηλικών μετάλλων (Blokhina et al, 2003, Ferguson, 2001).

Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

- i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας,
- ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans et al., 1996). Οι πολυφαινόλες μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους. Δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (Αντίδραση 1).

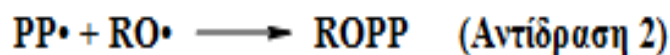


$\text{RO}\cdot$: ελεύθερη ρίζα

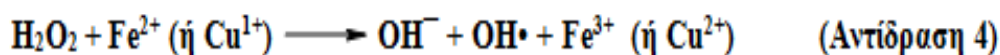
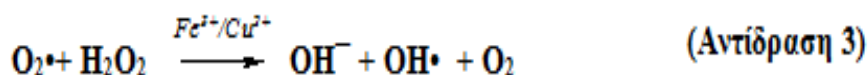
PPH : πολυφαινολική ένωση

$\text{PP}\cdot$: φαινολική ρίζα

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινολικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (Αντίδραση 2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



Μια ακόμη ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (Αντίδραση 3) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό, που καθιστά ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή, ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια είναι ότι εκτός της χηλικής δέσμευσης ενός δισθενούς κατιόντος διατηρούν και την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002).



Οι φυτικές πολυφαινόλες όμως εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ROS. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li & Trush 1994, Rahman et al., 1989). Η παραγωγή ROS από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα (Yoshino et al., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό $\text{OH}\cdot$.


Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινόλων είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino et al., 1999) και έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινόλων. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες


δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto et al., 2003, Fukumoto & Mazza 2000).

1.3. ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ

1.3.1. Γενικά

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιοτριβεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι:

 Ελαιοπυρήνας: αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού).

 Υγρά απόβλητα ,που είναι γνωστά και ως " λιοζούμι", " κατσίγαρος" ή "μούργα".

Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που προστίθεται στις διάφορες φάσεις επεξεργασίας του για την παραλαβή του λαδιού. Ουσιαστικά, πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, αλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαιολάδου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανό να δημιουργήσει φαινόμενα ευτροφισμού σε περιπτώσεις που αποχύνεται σε αποδέκτες, όπως κλειστούς θαλάσσιους κόλπους, λίμνες κ.α.



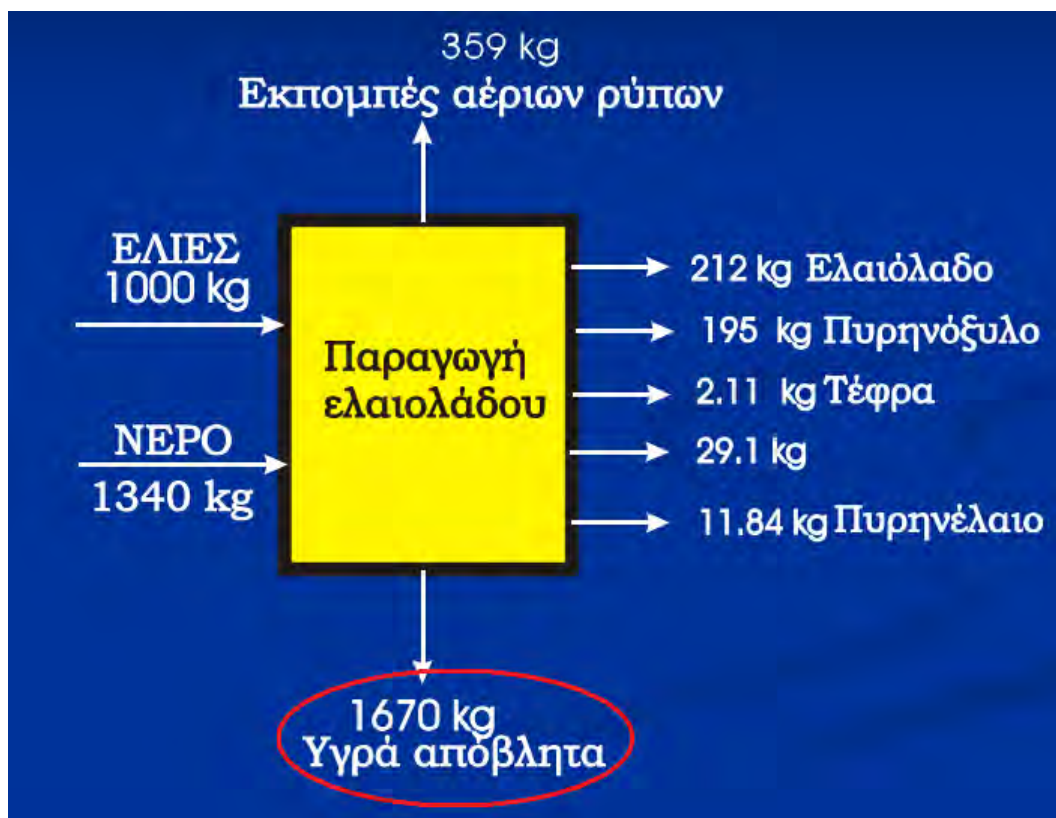
Εικόνα 7: Υγρά αποβλήτα ελαιοτριβείου.

1.3.2. Τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιοτριβείου

Α) Όγκος των αποβλήτων

Ο όγκος των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί επακριβώς, ούτε σε ένα ελαιοτριβείο, ούτε σε μία περιοχή και πολύ περισσότερο σε ολόκληρη τη Μεσόγειο, επειδή εξαρτάται από:

- ✖ Την ποικιλία του ελαιοκάρπου, το στάδιο ωρίμανσης και το χρόνο αποθήκευσής του πριν από την ελαιοποίηση
- ✖ Τον τρόπο διαχωρισμού του λαδιού από την ελαιοζύμη
- ✖ Το διαθέσιμο στο ελαιοτριβείο νερό και το κόστος προμήθειας του, αφού σε πολλά ελληνικά νησιά και όχι μόνο, το πλύσιμο του ελαιοκάρπου παραλείπεται όταν το νερό είναι λιγοστό ή ακριβό
- ✖ Τις συνήθειες των κατά τόπους ελαιοτριβείων



Εικόνα 8: Προσεγγιστικός υπολογισμός παραγωγής κασιίγαρου ανά 1000 kg ελαιοκάρπου.

Β) Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων

Τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων είναι ένα σκούρο υγρό, το χρώμα του οποίου ποικίλλει ανάλογα με την τιμή του pH (καφέ σκούρο σε όξινο και πρασινωπό σε αλκαλικό). Θολό, χαρακτηριστικής οσμής, πλούσιο σε οργανικά και ανόργανα στοιχεία, τα οποία είναι διαλυμένα στην υδατική κυρίως φάση. Η γεύση του τέλος είναι πικρή. Συνήθως περιέχει μικρά σωματίδια καθώς και μία ποσότητα λαδιού υπό τη μορφή σταθερού γαλακτώματος.

Η σύσταση και τα φυτικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων εξαρτώνται άμεσα από τους παράγοντες εκείνους που επιδρούν στη φυσιολογία θρέψης και ωρίμανσης του ελαιοκάρπου. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

- ✖ Η ποικιλία του ελαιοκάρπου
- ✖ Οι κλιματολογικές συνθήκες
- ✖ Οι καλλιεργητικές τεχνικές
- ✖ Η προσβολή από ασθένειες
- ✖ Το στάδιο ωρίμανσης που γίνεται η συγκομιδή

Γενικά τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου αποτελούνται από 83- 92% νερό, 4- 16% οργανικά συστατικά και 1-2% ανόργανα συστατικά (Χατζηπαυλίδης, 1999). Το οργανικό κλάσμα αποτελείται από σάκχαρα (1- 8% μεταξύ των οποίων αραβινόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικά οξέα, όπως προσδιορίστηκαν σε μελέτη των Arienzo et al., 2003, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, λιπίδια, καθώς και φαινόλες και πηκτίνες). Όσον αφορά τις φαινόλες, συνήθως εμφανίζονται μικρού μοριακού βάρους ουσίες, όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η κατεχόλη, η μεθυλκατεχόλη και το καφεϊκό οξύ (Mulinacci N. et al., 2001).

Παράμετρος	Μέγιστο	Ελάχιστο
pH	6,7	4
Οξειδοαναγωγικό δυναμικό (mV)	-330	-80
Αγωγιμότητα (mS)	16	8
Πυκνότητα (g/L)	1.100	1.016
Χρώμα (U Pt-Co)	180.000	52.270
Θολότητα (NTU)	62.000	42.000
Διαλυμένα στερεά (g/L)	9	1
Καθιζάνοντα στερεά (ml/h)	250	10

Πίνακας 2: Μέγιστες και ελάχιστες τιμές των σημαντικότερων παραμέτρων ρύπανσης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων.

1.3.3. Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

Για την επεξεργασία και διάθεση του κατσίγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, οι οποίες παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσης κατά περίπτωση και έτσι δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

Πολλοί επιστήμονες εργάζονται πάνω στην εύρεση αποδοτικών και εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης των ΥΑΕ. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο διάφορες μέθοδοι, αλλά και συνδυασμοί αυτών, έχουν εφαρμοστεί, συμπεριλαμβανομένου χημικών, μηχανικών, φυσικών, βιολογικών και θερμικών μεθόδων. Παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας των μεθόδων αυτών.

Μηχανική Επεξεργασία	Φυσικοχημική επεξεργασία	Βιολογικά επεξεργασία
Διήθηση	Διαχωρισμός με μεμβράνες	Λίμνες εξάτμισης
Επίπλευση	Αποτέφρωση	Μέθοδος ενεργού ιλύος
Καθίζηση	Εξάτμιση	Αναερόβια επεξεργασία
Απολίπωση	Απόσταξη	
	Συσσωμάτωση	
	Προσρόφηση	
	Ηλεκτρόλυση	

Πίνακας 3: Μέθοδοι διαχείρισης ΥΑΕ.

1.3.4. Πολυφαινολικό περιεχόμενο των ΥΑΕ

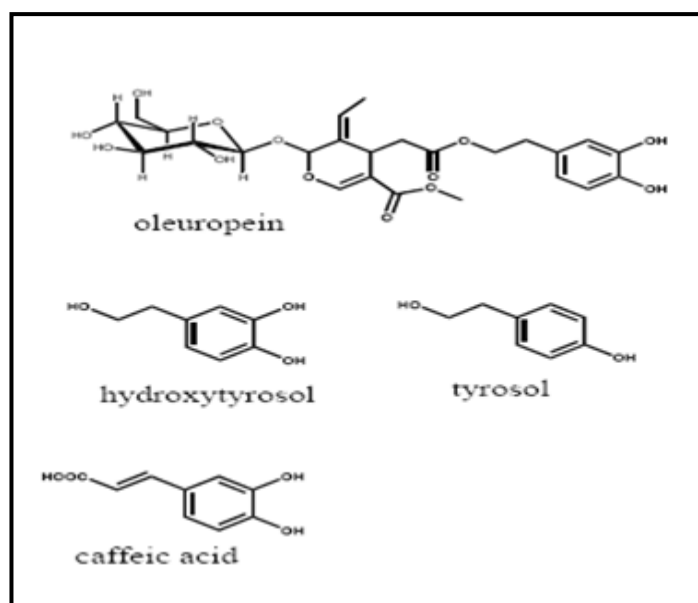
Η τοξικότητα και η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων των ελαιοτριβείων, οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες, συστατικά που προκαλούν τη δύσκολη αποικοδόμηση των εν λόγω ρύπων (Mekki A. et.al., 2007).

Τόσο τα ΥΑΕ, όσο και το ελαιόλαδο χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό πολυφαινολικό φορτίο. Ο όρος πολυφαινόλες έχει καθιερωθεί, χωρίς να σημαίνει ότι όλες οι φαινόλες είναι αρωματικοί υδρογονάνθρακες με περισσότερες από δύο υδροξυλομάδες. Για παράδειγμα το κιναμικό οξύ, το ελενολικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το κουϊνικό οξύ, φέρονται ως φαινολικά οξέα, παρόλο που έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο ή μία υδροξυλομάδα.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιοκάρπου μειώνεται η συγκέντρωση των πολυφαινολών, λόγω οξειδωτικών και υδrolυτικών διαδικασιών. Κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου, οι φαινολικές ενώσεις επηρεάζονται καθώς υφίστανται μερική διάλυση και έτσι στη συνέχεια αποπλένονται καταλήγοντας στα ΥΑΕ. (Tsimidou M.,et.al, 1992).

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Η υδροξυτυροσόλη μάλιστα είναι αποδεδειγμένα η πολυφαινόλη, που παρουσιάζει το υψηλότερο επίπεδο προστασίας, έναντι των ελευθέρων ριζών, που έχει ποτέ αναφερθεί μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών.

Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες φαινόλες που είναι παρούσες στο ελαιόλαδο όπως η το ελαιοευροπαίνη, καφεϊκό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το γεντιστικό οξύ, το σικιμικό οξύ, το p-φαινυλοξικό και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη, καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη.



Εικόνα 9: Ορισμένες από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο.

1.3.5. Μέθοδοι ανάκτησης των φαινολικών Ενώσεων από τα ΥΑΕ

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά στην ανάκτηση – εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχει κάποια ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος. Οι πλέον κοινές είναι:

- Εκχύλιση με διαλύτη (Baydar, et.al., 2004, Bucic et.al., 2007).
- Εκχύλιση με τις μεθόδους του υπερκρίσιμου ρευστού (Bleve et al, 2008, Nahar & Sarker, 2005, Palma & Taylor, 1999).

❖ Εκχύλιση υγρού – υγρού

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μία λειτουργία μεταφοράς μάζας, στην οποία ένα υγρό διάλυμα, που αρχικά περιέχει μία ή περισσότερες διαλυτές ουσίες, αναμιγνύεται με ένα άλλο υγρό (διαλύτης). Ο διαλύτης, παρουσιάζει καλύτερη επιλεκτικότητα προς ένα ή και περισσότερα από τα συστατικά του διαλύματος. Από αυτή την διαδικασία προκύπτουν δύο προϊόντα:

- Το εκχύλισμα, που περιέχει το επιθυμητό εξαγόμενο διάλυμα.
- Το ραφινρισμένο, που περιέχει το υπόλοιπο διάλυμα, με μικρή ποσότητα διαλυμένης ουσίας.

Αυτή η εκχύλιση, λειτουργεί πολύ καλά, εάν επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης.

❖ Εκχύλιση στερεού – υγρού

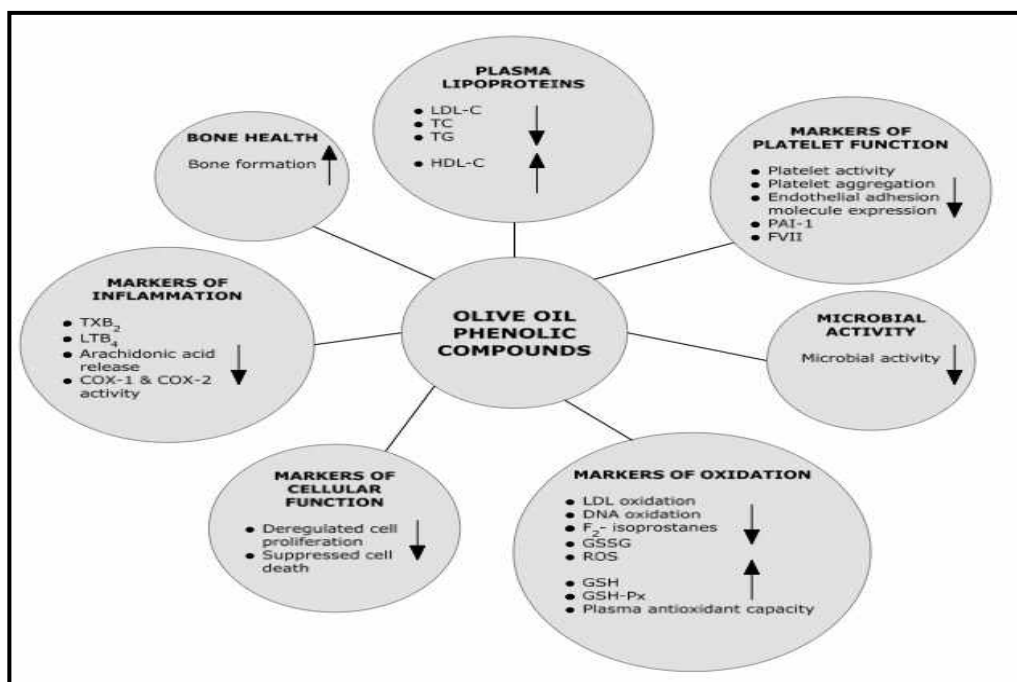
Η Εκχύλιση στερεού – υγρού , μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας, κατά το οποίο κάποια στερεά μόρια, αρχίζουν να αποχωρούν από την αρχική τους θέση και να κινούνται μέσα σε ένα διαλύτη, όταν αυτός ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό.

Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας, μπορεί να ενισχυθεί με αλλαγές στην συγκέντρωση, στον συντελεστή μεταφοράς (diffusion coefficient- m^2/s) και στο οριακό στρώμα (boundary layer) (Corrales, et.al., 2009). Αυτή η λειτουργία, χρησιμοποιείται ευρέως για ανάκτηση σπουδαίων συστατικών των τροφίμων, όπως φυσικά και αυτών των πολυφαινολικών συστατικών.

❖ Υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού (SFE - Supercritical Fluid Extraction)

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού (SFE) θα μπορούσε να είναι μια περιβαλλοντικά ευεργετική εναλλακτική λύση, έναντι της συμβατικής εκχύλισης, με οργανικό διαλύτη των βιολογικών ενώσεων. Οι μέθοδοι (SFE) είναι ταχείες, αυτοματοποιημένες, επιλεκτικές και αποφεύγεται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών διαλυτών. Επιπλέον, η απουσία του φωτός και του αέρα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης μειώνει την υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης. (Bleve et.al.,2008). Αυτή η εκχύλιση βασίζεται στο γεγονός ότι, πλησίον του κρίσιμου σημείου, το υγρό αλλάζει τις ιδιότητές του, μόνο με μερικές διακυμάνσεις στην πίεση (Palenzuela et.al., 2004).

Τα υπερκρίσιμα ρευστά τα τελευταία χρόνια λαμβάνουν τη θέση οργανικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο και άλλα, που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική εκχύλιση, καθαρισμό και διαδικασίες κρυστάλλωσης. Μέχρι στιγμής, το υπερκρίσιμο υγρό που χρησιμοποιείται, είναι αυτό του διοξειδίου του άνθρακα, που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον, είναι χαμηλής τοξικότητας, δεν είναι αναφλέξιμο και παρέχει συμβατότητα με τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Επιπλέον, έχει μέτρια κρίσιμες συνθήκες, μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από διαλυμένες ουσίες και είναι οικονομικό.



Εικόνα 10: Αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου σε διάφορους βιοδείκτες.

1.3.6 Ενθυλάκωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος που ανακτήθηκε από τα ΥΑΕ

Στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και φαρμάκων χρησιμοποιείται συχνά μία τεχνική η οποία ονομάζεται ενθυλάκωση. Κατά την ενθυλάκωση έχουμε από τη μία την ουσία η οποία πρόκειται να ενθυλακωθεί (load) και από την άλλη έναν αμφίφιλο φορέα ενθυλάκωσης (carrier). Αυτές οι δύο ουσίες ομογενοποιούνται σε νερό και κατόπιν το εναιώρημα που προκύπτει διοχετεύεται σε ειδικά μηχανήματα που πραγματοποιούν την ενθυλάκωση.

Η συνηθέστερη μέθοδος ενθυλάκωσης που χρησιμοποιείται είναι το spray drying και το μηχάνημα ονομάζεται spray dryer. Το spray dryer, στο οποίο επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες ($>100^{\circ}\text{C}$) λαμβάνει το υγρό εναιώρημα, το οποίο καθώς εισέρχεται στο μηχάνημα μετατρέπεται σε μικρά σταγονίδια (atomization). Το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας μεγάλης επιφάνειας η οποία είναι διαθέσιμη προς ξήρανση. Έτσι, λόγω του μεγέθους των σταγονιδίων και των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν, το νερό που περιέχεται εξατμίζεται ταχέως και ο εκάστοτε φορέας ενθυλάκωσης δημιουργεί έναν τύπο κελύφους γύρω από την ουσία (load) (Kumar, 2009). Με αυτόν τον τρόπο καταλήγουμε να έχουμε από τα σταγονίδια (υγρό) -> σωματίδια (στερεό).

Στην παρούσα μελέτη προκειμένου να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, που ανακτήθηκε από τα ΥΑΕ κρίθηκε καλό να ενθυλακωθεί με την παραπάνω τεχνική, χρησιμοποιώντας ως ενθυλακωτικά μέσα την πρωτεΐνη τυρογάλακτος και την μαλτοδεξτρίνη.

2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, το οποίο ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey protein). Έτσι, ένα πολυφαινολικό εκχύλισμα που απομονώθηκε από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη υπό 5 διαφορετικές συνθήκες καθώς και σε πρωτεΐνη whey υπό 7 διαφορετικές συνθήκες. Επομένως, ελέγχθηκαν συνολικά, 12 διαφορετικά δείγματα.

Για την *in vitro* εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τρεις μέθοδοι. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία εξουδετέρωσης της σταθερής χημικής ρίζας **ABTS^{•+}**. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (**ROO[•]**) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των δειγμάτων. Τέλος, με **κυτταρομετρία ροής** εξετάστηκε η ικανότητα των δύο ισχυρότερων δειγμάτων να βελτιώσουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, αξιολογώντας τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού stress GSH και ROS.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).
Συγκεκριμένα:

❖ Για τη μέθοδο ABTS:

- ✓ H_2O_2 (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) (Merck)
- ✓ ABTS [2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ)] (Sigma)
- ✓ HRP (Horseradish Peroxidase) (Sigma cat no.125K7415)

❖ Για τη μέθοδο επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA:

- ✓ AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride)]
 - ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο
 - ✓ Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
 - ✓ Γλυκερόλη
 - ✓ Αγαρόζη
 - ✓ DNA Bluescript plasmid 3,2 μg
 - ✓ EDTA
 - ✓ Βορικό οξύ
 - ✓ Tris-HCl
 - ✓ Χλωριούχο κάλιο (KCl)
 - ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)
 - ✓ Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4)
 - ✓ Χλωριούχο νάτριο NaCl
- } Loading buffer
- } TBE
- } PBS (Phosphate buffer saline)

3.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι δείκτες οξειδωτικού stress GSH και ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής.

- ❖ Για την καλλιέργεια των κυττάρων EA.hy926 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε τα εξής:

- ✓ 1 g/l Glucose
 - ✓ Pyruvate
 - ✓ 25 mM HEPES
 - ✓ L-γλουταμίνη
- } DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium)

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υλικά:

α) Θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων:

- 250 ml DMEM
- 25 ml FBS
- 2,5 ml Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (αντιβιοτικά)
- 2,5 ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών αραιώσεων των δειγμάτων:

- 250 ml DMEM
- 2,5 ml Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (αντιβιοτικά)
- 2,5 ml Γλουταμίνη

- ❖ Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων με τη μέθοδο XTT, που έπρεπε να προηγηθεί της διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής:

- ✓ Τρυψίνη 0,25%
- ✓ Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

❖ Για την κυτταρομετρία ροής:

- ✓ BD FACS Clean Solution (BD Biosciences)
- ✓ BD FACS Sheath Solution (BD Biosciences)
- ✓ BD FACS Rinse Solution (BD Biosciences)
- ✓ Φθορίζουσα χρωστική mercury orange (Για τον προσδιορισμό της GSH)
- ✓ Χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Για τον προσδιορισμό των ROS)

3.1.3. Εκχύλισμα

Το εκχύλισμα από τα απόβλητα ελαιοτριβείου που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε και ενθυλακώθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος από το εργαστήριο Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ομώνυμου τμήματος του ΤΕΙ Λάρισας. Επικεφαλής της ομάδας ήταν ο επίκουρος καθηγητής Κωνσταντίνος Πετρωτός. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το σύνολο των 12 δειγμάτων που μελετήθηκαν καθώς και οι διαφορετικές συνθήκες ενθυλάκωσής τους.

Αριθμός δείγματος	Θερμοκρασία εισαγωγής (°C)	Θερμοκρασία εξαγωγής (°C)	Αναρροφητήρας (%)	Αντληση (%)	Πολυφαινόλες (ml)	Tween 80 (ml)	Πρωτεΐνη (gr)	Μαλτοδεξτρίνη (gr)	H ₂ O (ml)	Σύνολο δείγματος (ml)
1	120	80	100	5	75	25	50		350	500
2	120	82	100	5	37,5	12,5	25		175	250
3	120	82	100	5	37,5	12,5	25		175	250
4	140	90	100	5	37,5	12,5	25		175	250
5	160	98	100	5	37,5	12,5	25		175	250
6	100	72	100	5	37,5	12,5	25		175	250
7	100	66	100	5	37,5	12,5	25		175	250
8	100	67	100	5	37,5	12,5		25	175	250
10	140	84	100	5	37,5	12,5		25	175	250
11	160	96	100	5	37,5	12,5		25	175	250
15	180	97	100	10	37,5	12,5		25	175	250
16	100	57	100	10	37,5	12,5		25	175	250

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας του πλήθους των δειγμάτων που εξετάσθηκαν και των συνθηκών ενθυλάκωσής τους.

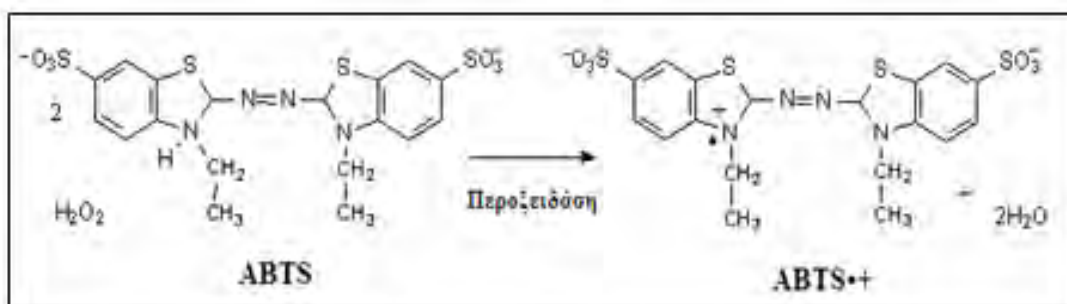
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ABTS^{•+} scavenging assay

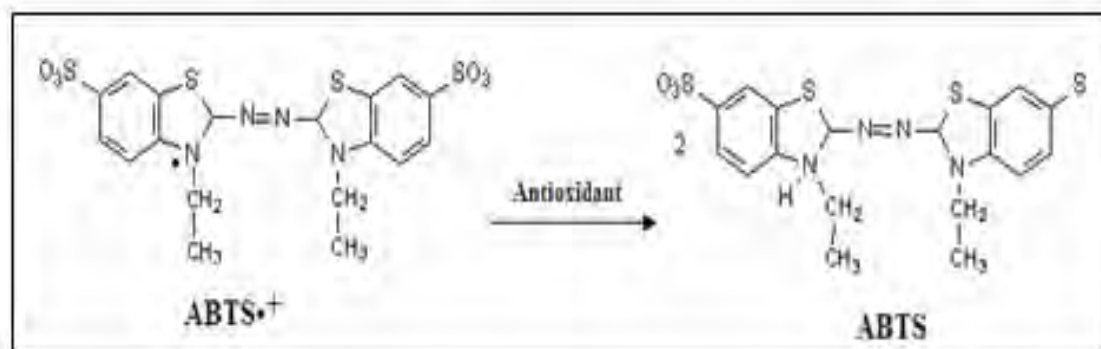
3.2.1.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου HRP, οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+}. Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και έπειτα να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας, ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και με συνέπεια τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005, Miller et al, 1993, Re et al, 1999)



Εικόνα 11: Παραγωγή της ρίζας του ABTS, μέσω δράσης της περοξειδάσης παρουσία H₂O₂.



Εικόνα 12: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα του ABTS.

3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10,97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H₂O.

Διάλυμα H₂O₂ (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8 M αραιώνουμε με H₂O₂, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο, γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον, διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά erpenforfs στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και το ένζυμο HRP. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του

εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (π.χ. 50, 100, 200, 400, 800, 1600 $\mu\text{g/ml}$), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

3x	Blank (μl)	Control (μl)	C1 (μl)	C2 (μl)	C3 (μl)	C4 (μl)	C5 (μl)	C6 (μl)
H ₂ O	450	400	400	400	400	400	400	400
ABTS	500	500	500	500	500	500	500	500
H ₂ O ₂	50	50	50	50	50	50	50	50
HRP	-	50	50	50	50	50	50	50
Υτελ	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
ΕΠΩΑΣΗ 45 ΛΕΠΤΑ								
Εκχύλισμα	-	-	50	50	50	50	50	50

Πίνακας 5: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων.

Όλες οι συγκεντρώσεις εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε δείγμα, ενώ το διάλυμα των αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂ και HRP) χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη του εκχυλίσματος ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου όπως φαίνεται παρακάτω. Σε αυτό το στάδιο όλες οι συγκεντρώσεις εξετάζονται εις διπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε δείγμα.

2x	Blank (μl)	C1 (μl)	C2 (μl)	C3 (μl)	C4 (μl)	C5 (μl)	C6 (μl)
H ₂ O	450	400	400	400	400	400	400
ABTS	500	500	500	500	500	500	500
H ₂ O ₂	50	50	50	50	50	50	50
Υτελ	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Εκχύλισμα	-	50	50	50	50	50	50

Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

3.2.1.3. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενου δείγματος υπολογίστηκε ως το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+} σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ Δέσμευση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του control

A_s : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος

Επίσης, από τα διαγράμματα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων στην οποία προκαλούνταν δέσμευση- εξουδετέρωση της ρίζας ABTS^{•+} κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

3.2.2. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

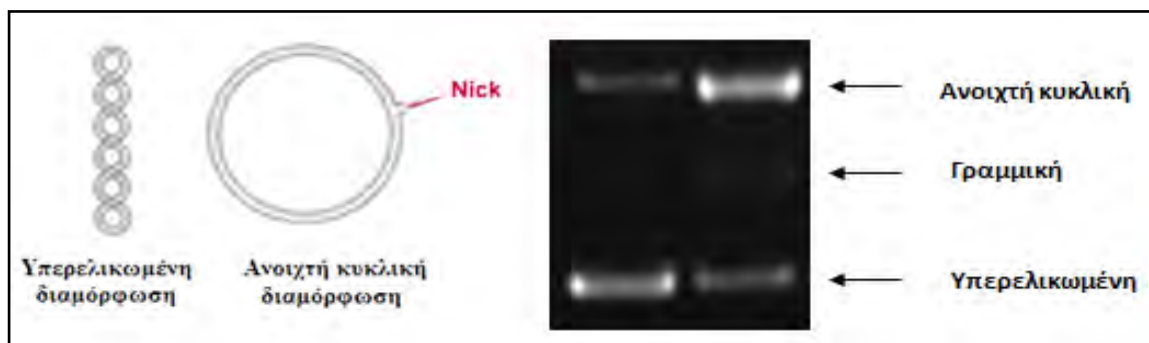
3.2.2.1. Γενικά

Το πλασμιδιακό DNA είναι ένα κυκλικό, δίκλωνο μόριο DNA το οποίο βρίσκεται κυρίως σε βακτήρια και έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται από μόνο του. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα πλασμιδιακού DNA τα οποία τα βοηθούν να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες, μιας και φέρουν συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Ακόμη, λόγω της ικανότητας των πλασμιδίων να μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο, δίνεται η δυνατότητα να μεταφέρονται πληροφορίες, οι οποίες συμβάλλουν στην επιβίωσή τους.

Όταν το πλασμιδιακό DNA τρέχει σε ένα πήκτωμα αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση, εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις:

- 🌈 Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
- 🌈 Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- 🌈 Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα στο πήκτωμα, καθώς όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση, τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Επομένως, το υπερελικωμένο τρέχει πρώτο, δεύτερο το γραμμικό και τρίτο το ανοιχτό κυκλικό.



Εικόνα 13: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA και πως αυτές εμφανίζονται καθώς τρέχουν σε πήκτωμα αгарόζης.

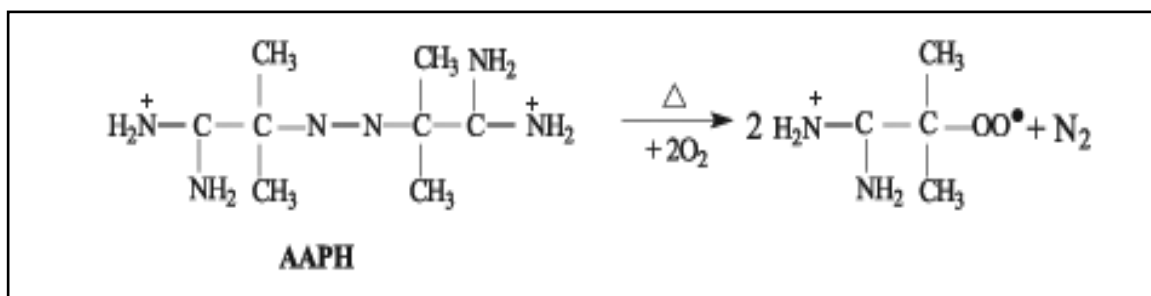
Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης του πλασμιδιακού DNA από την υπερελικωμένη διαμόρφωση στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

3.2.2.2. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων έναντι της επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (ROO^\bullet) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al., 2001.

Οι ρίζες ROO^\bullet είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη μιας αλληλουχίας αντιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την οξείδωση των λιπιδίων. Επίσης, οι ρίζες ROO^\bullet έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα θραύσματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO^\bullet χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO^\bullet .



Εικόνα 14: Η αντίδραση θερμόλυσης του AAPH κατά την οποία παράγεται άζωτο και δύο ρίζες αλκυλίου, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με το οξυγόνο, παράγοντας τις ρίζες περοξυλίου ROO^\bullet .

3.2.2.3. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,24 g αгарόζης σε 30 ml TBE 1x και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια, γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4): NaCl 137 mM (8 gr/ 1000 ml), KCl 2,7 mM (0,2 gr/ 1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1 mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 100 mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

- **AAPH 10 mM**: προκύπτει με αραιώση του διαλύματος AAPH 100mM Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων σε επτά συγκεντρώσεις μεταξύ των 50, 100, 200, 400, 800, 1600 και 3200 μg/ml. Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2 μg, AAPH 10 mM και το εξεταζόμενο δείγμα στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα. Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό και ένα θετικό control, καθώς και ένα control του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1600 ή 3200 μg/ml κατά περίπτωση).

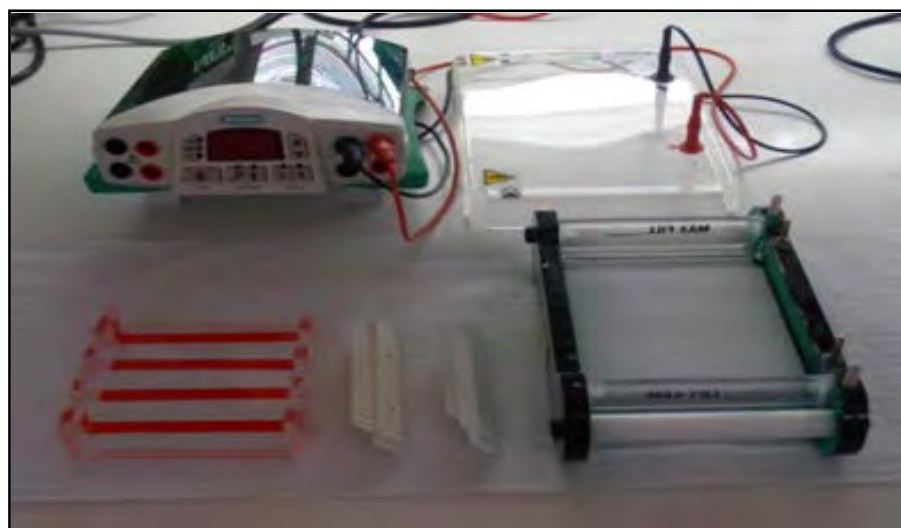
	PBS (μl)	Δείγμα (μl)	DNA plasmid (μl)	AAPH (μl)
Αρνητικό control	8	-	2	-
Θετικό control	4	-	2	4
Δείγμα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις	1	3	2	4
Δείγμα στη μέγιστη συγκέντρωση	5	3	2	-

Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων.

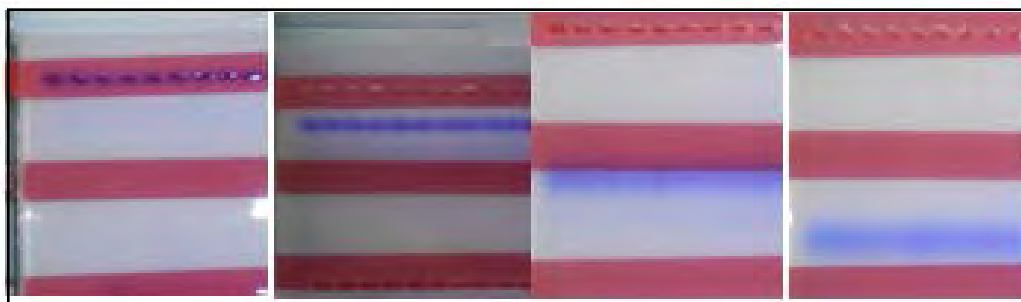
Μετά την προσθήκη των υλικών κατά την παραπάνω σειρά ακολουθούν:

- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 70 V για 1h σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%
- Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία (MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech)
- Ποσοτικοποίηση (με το λογισμικό Alpha View της Alpha Innotech)

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως κάθε πείραμα διεξαγόταν τουλάχιστον τρεις φορές.



Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 16: Στάδια απομάκρυνσης των χρωματισμένων ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 17: Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech.

3.2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^{\bullet} , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ Αναστολή } = [(S_0 - S) / (S_{\text{control}} - S_0)] \times 100$$

S_{control} : Ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control

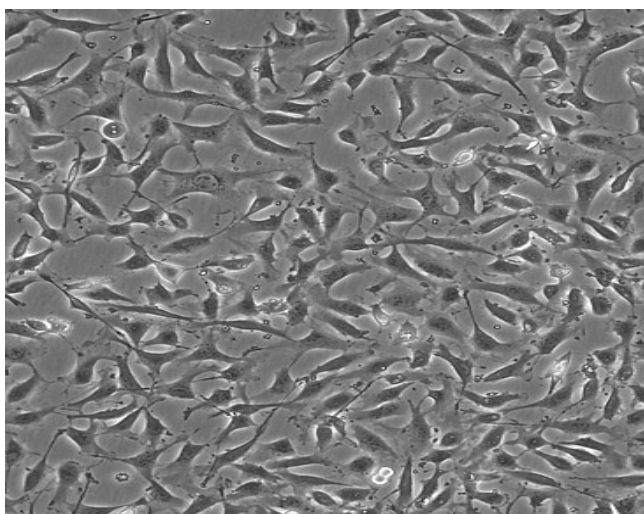
S_0 : Ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου στο θετικού control

S : Ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα, καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα AAPH

3.2.3. Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά EA.hy926 (ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου). Πρόκειται για μία υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο καρκίνωμα πνεύμονα (A549). Η αθανοτοποιημένη κυτταρική σειρά που προέκυψε διαθέτει πολλές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων και επίσης μπορεί και αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Ακόμη, διαθέτει ένα μοναδικό χρωμοσωμικό δείκτη που βοηθά στην εύκολη ταυτοποίηση τους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την εν λόγω κυτταρική σειρά χρήσιμη για τη μελέτη των ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου (Bauer J. et al, 1992).

Η κυτταρική σειρά EA.hy926 αναπτύχθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 25cm² με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε, γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 330 μl τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 4 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5ml) με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

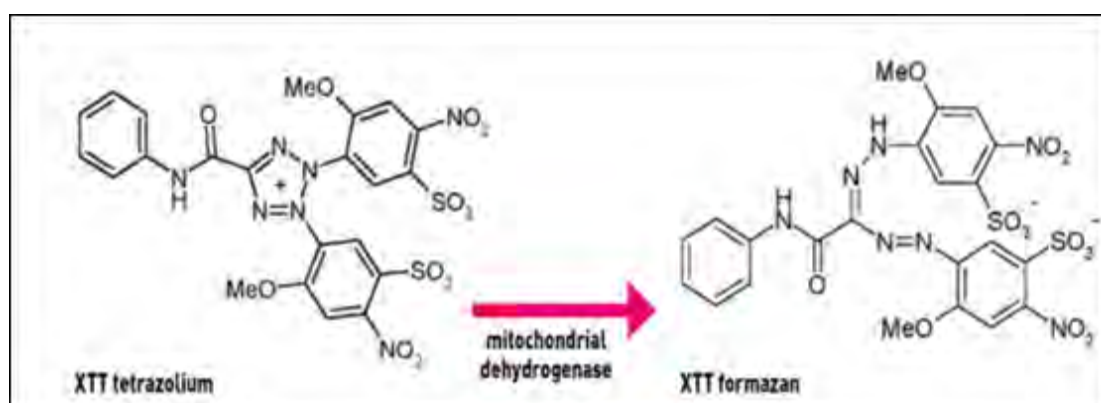


Εικόνα 18: Καλλιέργεια κυττάρων EA.hy926 σε οπτικό μικροσκόπιο.

3.2.4. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

3.2.4.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων στην κυτταρική σειρά EA.hy926, που έπρεπε να προηγηθεί της διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμεωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμεωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



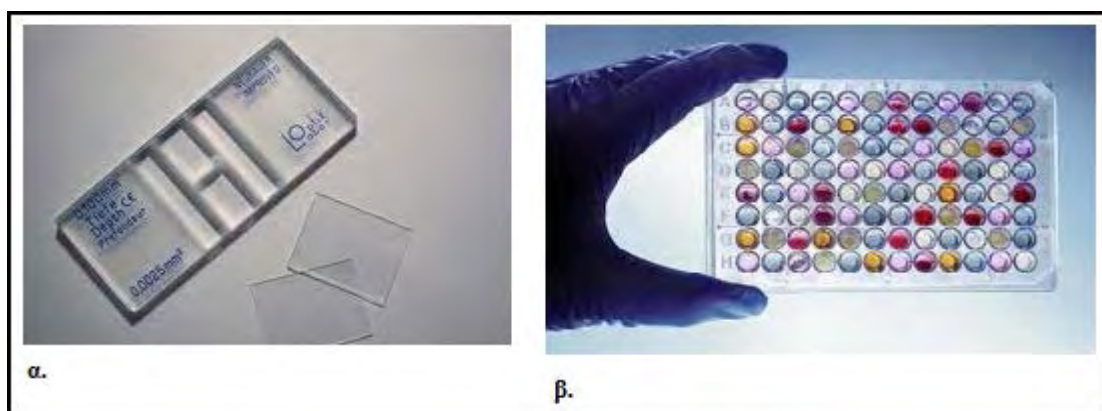
Εικόνα 19: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα..

3.2.4.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθονταν 5000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το

πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Σημειώνεται ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν τα εξεταζόμενα δείγματα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των δειγμάτων επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του κάθε δείγματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν εις τριπλούν. Η % αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων από τα εξεταζόμενα δείγματα υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$



Εικόνα 20: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer και καλυπτρίδες
β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του

3.2.4.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

3.2.5. Κυτταρομετρία ροής

3.2.5.1. Αρχή μεθόδου

Κυτταρομετρία είναι η διαδικασία μέτρησης φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Στην κυτταρομετρία ροής οι μετρήσεις γίνονται καθώς τα κύτταρα ρέουν ενώ βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα. Είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου (ή σωματιδίου) καθώς αυτό περνάει από μια δέσμη φωτός. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ερευνητικές ή κλινικές εφαρμογές, καθώς και για την ανάλυση ευκαρυωτικών κυττάρων, βακτηρίων και χρωμοσωμάτων.

Στην κυτταρομετρία ροής όλα τα δείγματα πρέπει να είναι σε μορφή διαλύματος. Είναι δυνατή η ανάλυση κυττάρων από στερεούς ιστούς, αλλά θα πρέπει πρώτα να διαχωριστούν τα κύτταρα και να εναιωρηθούν σε κάποιο διαλύτη. Ένα κυτταρόμετρο ροής συνήθως μπορεί να αναλύσει κύτταρα (ή σωματίδια) με μέγεθος 0,5-50 μm . Τέλος, με την κυτταρομετρία ροής δεν μετράται μόνο το μέγεθος ενός κυττάρου (ή σωματιδίου), αλλά και η εσωτερική του πολυπλοκότητα και η ένταση του φθορισμού του.

Η λειτουργία ενός κυτταρομέτρου ροής βασίζεται σε 3 κύρια μέρη:

- Το ρευστό σύστημα (το σύνολο των διαφόρων διαλυμάτων που χρειάζονται για τη λειτουργία του).
- Το οπτικό σύστημα.
- Το ηλεκτρονικό σύστημα.

- Ρευστό σύστημα

Το ρευστό σύστημα (τα διαλύματα που τοποθετούμε στο κυτταρόμετρο) φέρνει τα κύτταρα στο ‘σημείο εξέτασης’ όπου προσπίπτει στα κύτταρα η δέσμη laser, και μάλιστα για να είναι σωστή η μέτρηση θα πρέπει τα κύτταρα να συναντούν τη δέσμη laser ακριβώς στο κέντρο της. Κάθε φορά που ένα κύτταρο (ή σωματίδιο) περνά από το σημείο εξέτασης και το συναντά (εξετάζει) η δέσμη laser αυτό ονομάζεται ‘συμβάν’ (event). Τα κύτταρα κινούνται προς το ‘σημείο εξέτασης’ μέσα σε ένα διάλυμα που λέγεται ‘κεντρικό δείγμα’. Στο ‘σημείο εξέτασης’ η δέσμη laser προσπίπτει στα κύτταρα και η ακτινοβολία σκεδάζει, ενώ ταυτόχρονα εκπέμπεται φθορισμός. Τα κύτταρα περνάνε από το ‘σημείο εξέτασης’ ανά ένα κάθε φορά, δηλαδή δημιουργείται μια ροή κυττάρων έτσι ώστε το ένα να κινείται πίσω από το άλλο σε σειρά. Ο μεταλλικός σωλήνας μέσω του οποίου τα κύτταρα εισέρχονται στο κυτταρόμετρο ονομάζεται ‘σωλήνας ροής’. Μέσα στο σωλήνα ροής, το ‘κεντρικό δείγμα’ περιβάλλεται από ένα άλλο διάλυμα που ονομάζεται ‘διάλυμα κάλυψης’ (sheath fluid). Ο σωλήνας ροής έχει τέτοιο σχήμα ώστε το κεντρικό δείγμα να κινείται στο κέντρο του διαλύματος κάλυψης χωρίς να αναμιγνύονται τα δύο διαλύματα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται υδροδυναμική εστίαση. Στην υδροδυναμική εστίαση οφείλεται ουσιαστικά η κίνηση των κυττάρων σε μονή σειρά, δηλαδή η κίνηση του ενός μετά το άλλο μέσα στο σωλήνα ροής. Το κεντρικό δείγμα πρέπει να έχει πάντα μεγαλύτερη πίεση από το δείγμα κάλυψης. Το κυτταρόμετρο ροής μας δίνει τη δυνατότητα να μεταβάλλουμε την πίεση του κεντρικού δείγματος, αναλόγως τις ανάγκες της μέτρησης.

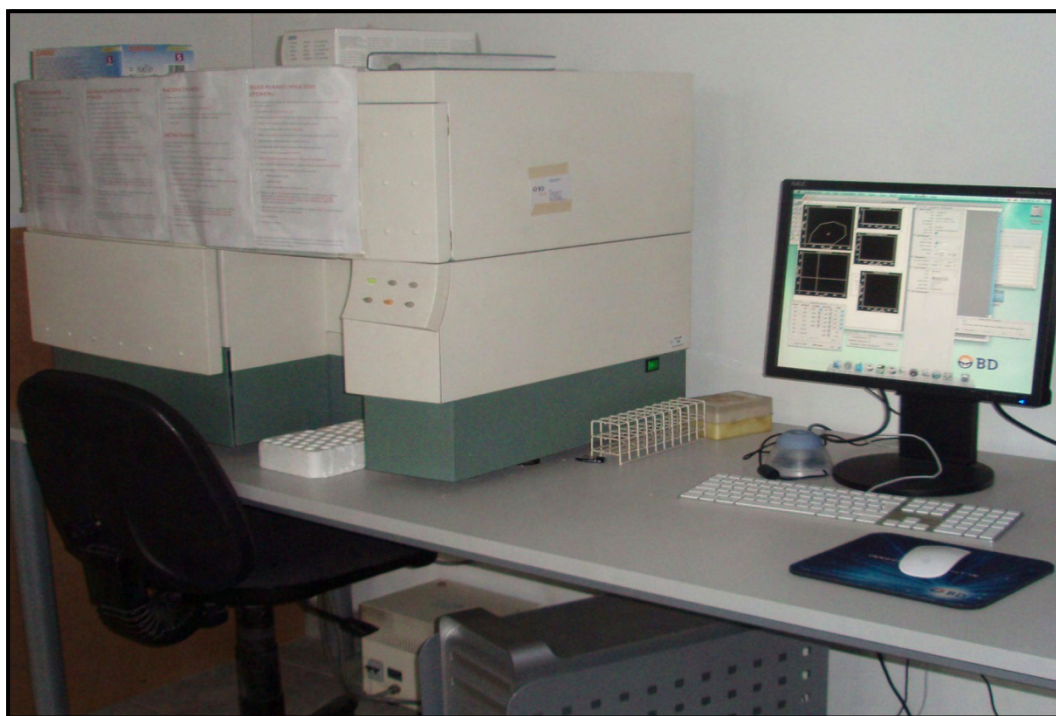
- Οπτικό σύστημα

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύστημα οπτικής διέγερσης (excitation) και το σύστημα οπτικής συλλογής (collection). Το σύστημα οπτικής διέγερσης, αποτελείται από την πηγή φωτός (laser) και από τα εξαρτήματα (οπτικές ίνες, φακούς και πρίσματα) που κατευθύνουν τη δέσμη laser στα κύτταρα, τα οποία διεγείρουν για να εκπέμψουν φθορίζουσα ακτινοβολία. Συνήθως, τα περισσότερα κυτταρόμετρα έχουν 2 ή 3 πηγές ακτινοβολίας laser με διαφορετικό μήκος κύματος. Υπάρχουν όμως και κυτταρόμετρα που μπορεί να έχουν έως και 12 laser διαφορετικού μήκους κύματος. Όταν η ακτινοβολία συναντήσει τα κύτταρα τότε σκεδάζει (διασκορπίζεται) σε 2 κατευθύνσεις. Ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση παράλληλη ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ονομάζεται εμπρόσθιος σκεδασμός (forward scatter) και είναι ανάλογος του μεγέθους του κυττάρου. Ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση κάθετη ως προς την προσπίπτουσα

ακτινοβολία ονομάζεται ‘πλευρικός σκεδασμός’ (side scatter) και είναι ανάλογος της εσωτερικής πολυπλοκότητας του κυττάρου. Εκτός από τον σκεδασμό, συμβαίνει και φθορισμός της ακτινοβολίας. Το σύστημα οπτικής συλλογής κατευθύνει την σκεδάζουσα και τη φθορίζουσα ακτινοβολία, δηλαδή την εκπεμπόμενη ακτινοβολία (emission light) σε ‘ανιχνευτές’ (detectors) ακτινοβολίας

- Ηλεκτρονικό σύστημα

Το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους ανιχνευτές, τους ενισχυτές σήματος, τους επεξεργαστές σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αρχικά, οι ανιχνευτές μετατρέπουν το φωτεινό σήμα, που φτάνει σε αυτούς από το σύστημα οπτικής συλλογής, σε ηλεκτρονικό σήμα (ηλεκτρικό ρεύμα). Το ηλεκτρονικό σήμα στη συνέχεια αυξάνεται από τους ενισχυτές. Οι επεξεργαστές σήματος μετατρέπουν το ενισχυμένο ηλεκτρονικό σήμα σε ψηφιακό σήμα που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη αριθμητική τιμή και το στέλνουν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι, στον ηλεκτρονικό υπολογιστή αποθηκεύονται σε ψηφιακή μορφή οι πληροφορίες για κάθε κύτταρο και μπορούν στη συνέχεια να επεξεργαστούν με διάφορους τρόπους. Συγκεκριμένα, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μπορεί να κάνει στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και να τα παρουσιάσει με μορφή διαφόρων διαγραμμάτων.



Εικόνα 21: Κυτταρόμετρο ροής.

3.2.5.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, φροντίζουμε να έχουμε στη διάθεσή μας φλάσκες, με κάλυψη από κύτταρα 75-80%, τόσες όσες οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος που θέλουμε να ελέγξουμε συν μία επιπλέον η οποία δε θα περιέχει το εκχύλισμα και θα χρησιμεύσει ως control. Εφόσον έχουμε στα χέρια μας τον αριθμό φλασκών που χρειαζόμαστε ακολουθεί η εξής διαδικασία:

Από τις φλάσκες στις οποίες σκοπεύουμε να εισάγουμε τις διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούμε πλύσεις με PBS. Εφόσον αφαιρεθεί το PBS, προσθέτουμε εκ νέου θρεπτικό υλικό ίδιας ποσότητας, το οποίο όμως τώρα δεν περιέχει FBS όπως προηγουμένως. Επιπλέον στις φλάσκες αυτές προστίθενται και οι εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του εκάστοτε δείγματος (200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$). Μετά την προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων, τα κύτταρα επωάζονται για 24 h και έπειτα ακολουθεί η αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια των φλασκών με χρήση τρυψίνης όπως περιγράφηκε και προηγουμένως (υποκεφάλαιο 3.2.3).

Σε αυτό το σημείο να σημειωθεί πως η φλάσκα control μέχρι το στάδιο της τρυψινοποίησης παραμένει ανέγγιχτη, δηλαδή δεν της έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό που περιέχει FBS και φυσικά δεν της έχει προστεθεί και οποιαδήποτε συγκέντρωση του δείγματος.

Μετά την τρυψινοποίηση επαναιωρούμε τα κύτταρα κάθε φλάσκας σε 4 mL θρεπτικού υλικού με 10% FBS και τα τοποθετούμε σε ισάριθμα falcons των 15 mL.

Συνεχίζοντας την διαδικασία, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- ✓ Τα falcons που έχουμε συλλέξει από κάθε φλάσκα φυγοκεντρούνται σε ταχύτητα 300 g και θερμοκρασία 5 °C, για 10 λεπτά.
- ✓ Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται διάλυμα PBS ίσης ποσότητας με αυτήν του θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση.
- ✓ Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται εκ νέου PBS σύμφωνα με τα παραπάνω.
- ✓ Το περιεχόμενο του κάθε falcon μεταφέρεται σε πλαστικά σωληνάκια (tubes).
- ✓ Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- ✓ Ακολουθεί επαναιώρηση σε PBS όγκου 150 μL και προσθήκη 15 μL χρωστικής.

Εάν ο δείκτης οξειδωτικού stress που μετράμε είναι η γλουταθειόνη (GSH), τότε η χρωστική που προσθέτουμε είναι η φθορίζουσα mercury orange (excitation 488 nm, emission 580 nm), η οποία συνδέεται με τη GSH.

Εάν ο δείκτης οξειδωτικού stress που μετράμε είναι οι ελεύθερες ρίζες (ROS), τότε χρησιμοποιούμε τη χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Η DCFDA μετά την είσοδό της στα κύτταρα αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Η DCF είναι μια φθορίζουσα χρωστική (excitation 495 nm, emission 529 nm) που μπορεί να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής. Άρα, από τα επίπεδα της DCF υπολογίζονται τα επίπεδα των ROS: όσο μεγαλύτερη η τιμή της DCF, τόσο περισσότερες οι ROS.

- ✓ Μετά την προσθήκη της χρωστικής τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και CO₂ 5% για 30 min και στην συνέχεια προσθέτουμε 250 μL PBS.
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 300 g και θερμοκρασία 5 °C, για 10 λεπτά.
- ✓ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προσθέτουμε 250 μL PBS.
- ✓ Τα δείγματα είναι έτοιμα προς ανάλυση.

Να σημειωθεί πως στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής ελέγχθηκε η επίδραση στους δείκτες οξειδωτικού stress GSH και ROS, μόνο των δύο ισχυρότερων δειγμάτων, όπως αυτά προέκυψαν από τις μεθόδους ABTS και ROO[•] από το σύνολο των 12 εξεταζόμενων δειγμάτων.

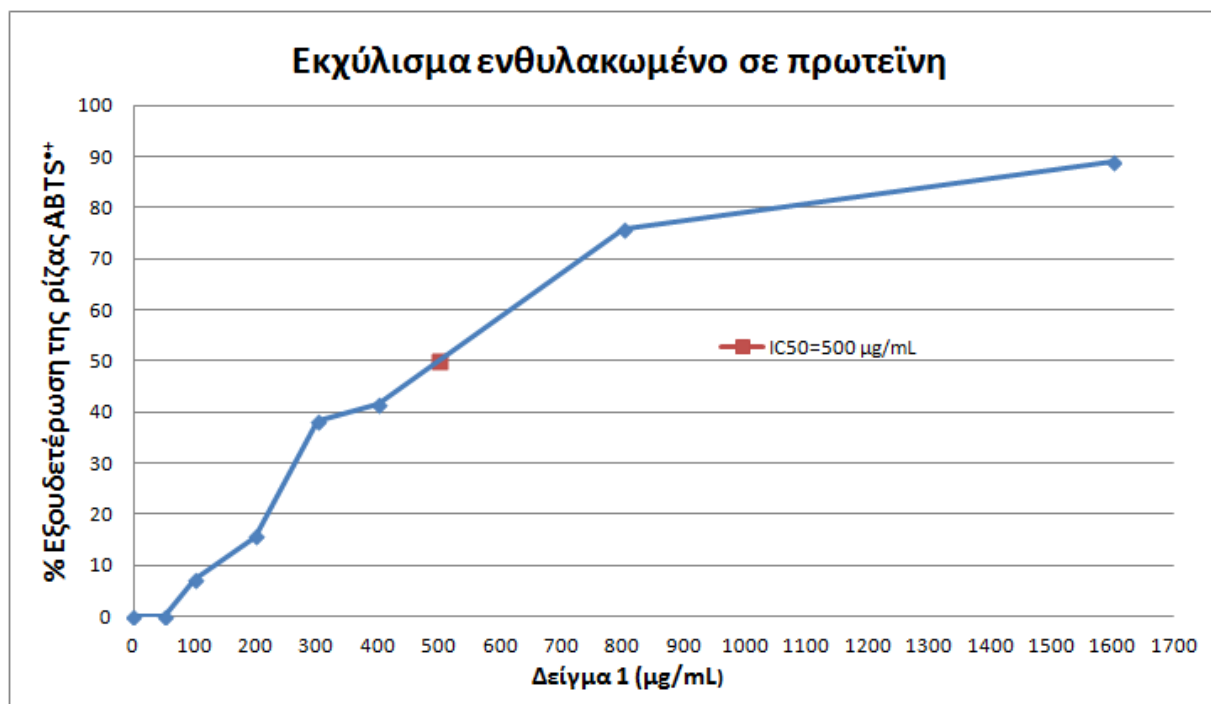
Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί πως η επίδραση των εν λόγω δειγμάτων εξετάστηκε τόσο απουσία, όσο και παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (tert-butyl hydroperoxide). Το t-BOOH έχει προταθεί πως προκαλεί οξειδωτικό stress, οξειδώνοντας την GSH (Sies and Summer, 1975, Lima et al., 2006) ή ακόμη και αλληλεπιδρώντας με ιόντα Fe²⁺ οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών tBO[•] (Hix et al., 2000). Έτσι, κατέστη δυνατό να παρατηρηθεί η επίδραση των εξεταζόμενων δειγμάτων στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των EA.hy926, τόσο όταν αυτά βρίσκονταν σε «ηρεμία», όσο και σε κατάσταση οξειδωτικού stress.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

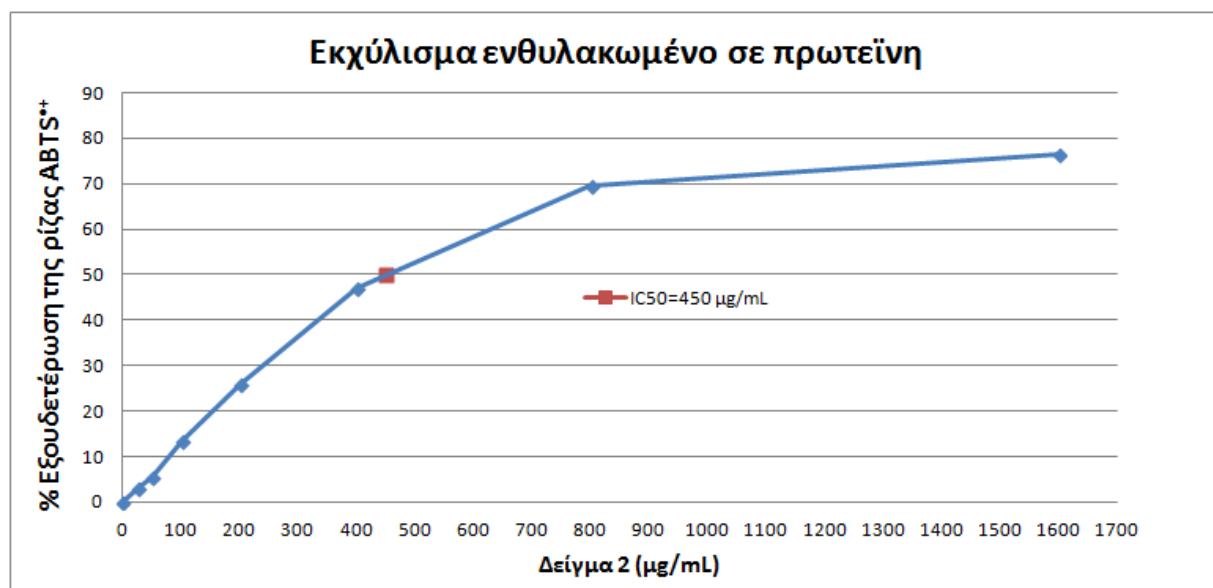
4.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}

Συνολικά μελετήθηκαν 12 δείγματα από απόβλητα ελαιοτριβείου τα οποία ήταν ενθυλακωμένα υπό διαφορετικές συνθήκες σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Τα δείγματα 3, 4, 5, 6, 7, 8 και 11 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$. Τα δείγματα 1 και 10 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 300, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$. Τέλος, τα δείγματα 2, 15 και 16 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 300, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$.

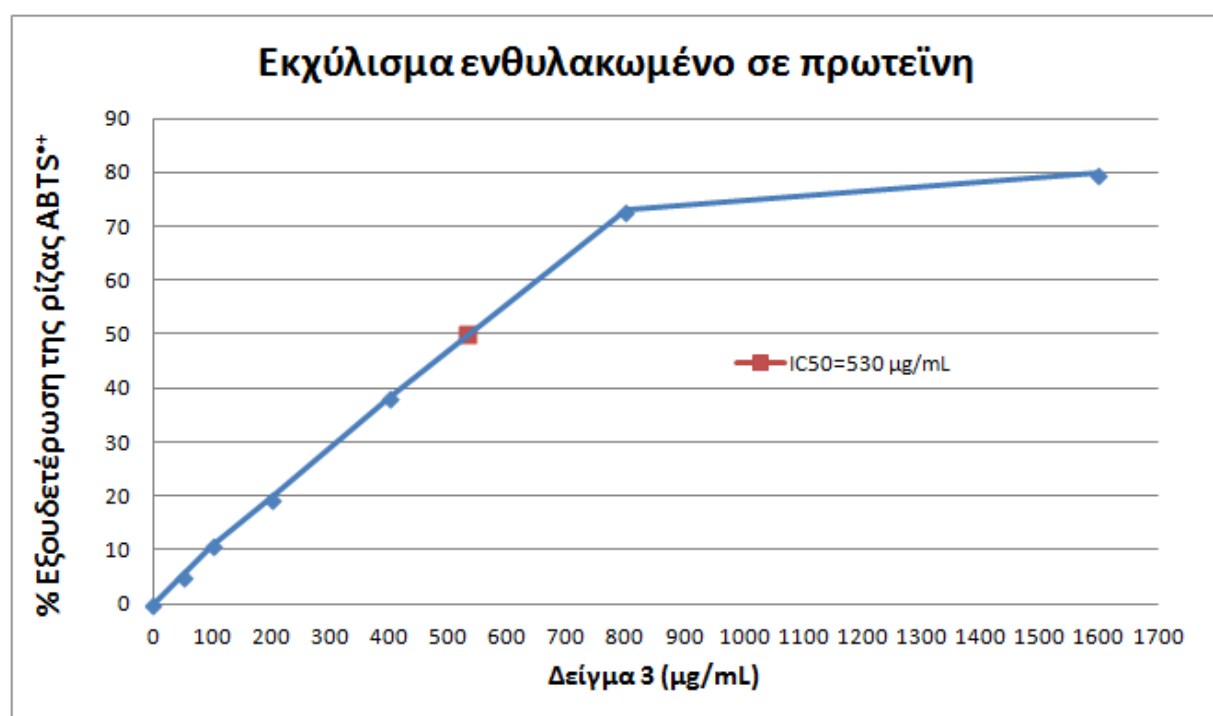
Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 219 ± 24 $\mu\text{g/ml}$ έως 547 ± 16 $\mu\text{g/ml}$. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα 15 με IC_{50} ίσο με 219 ± 24 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το πιο ασθενές ήταν το δείγμα 5 με IC_{50} ίσο με 547 ± 16 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % εξουδετέρωση (δέσμευση) της ρίζας ABTS^{•+} από τα εξετασθέντα δείγματα.



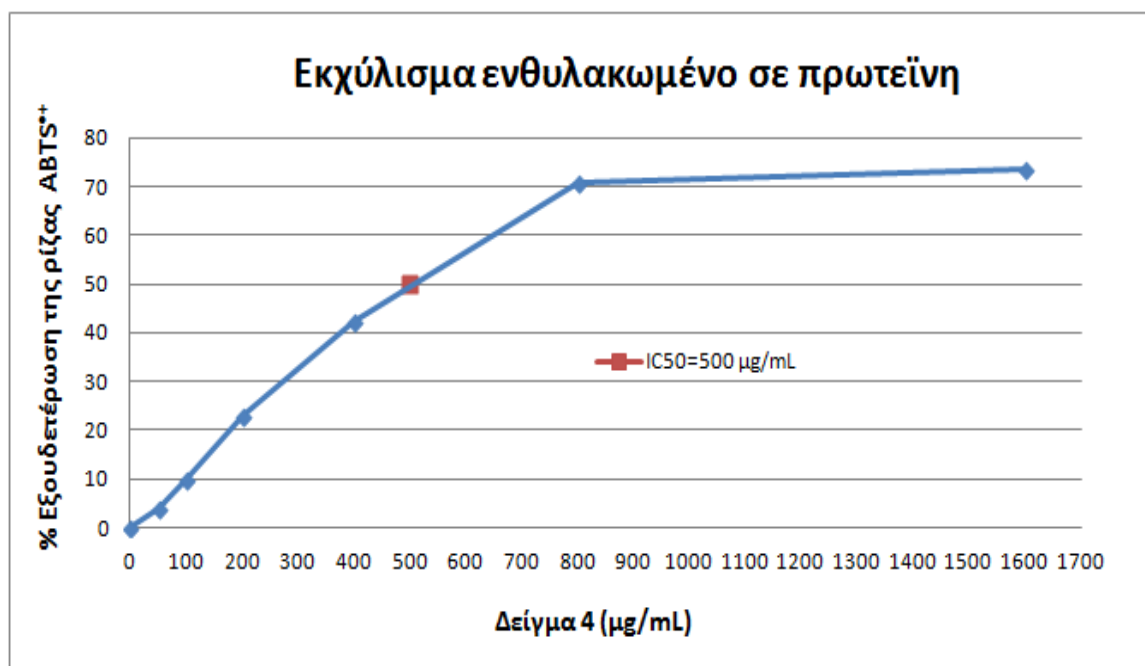
Γράφημα 1: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 1. $\text{IC}_{50} = 500 \pm 30$ $\mu\text{g/ml}$.



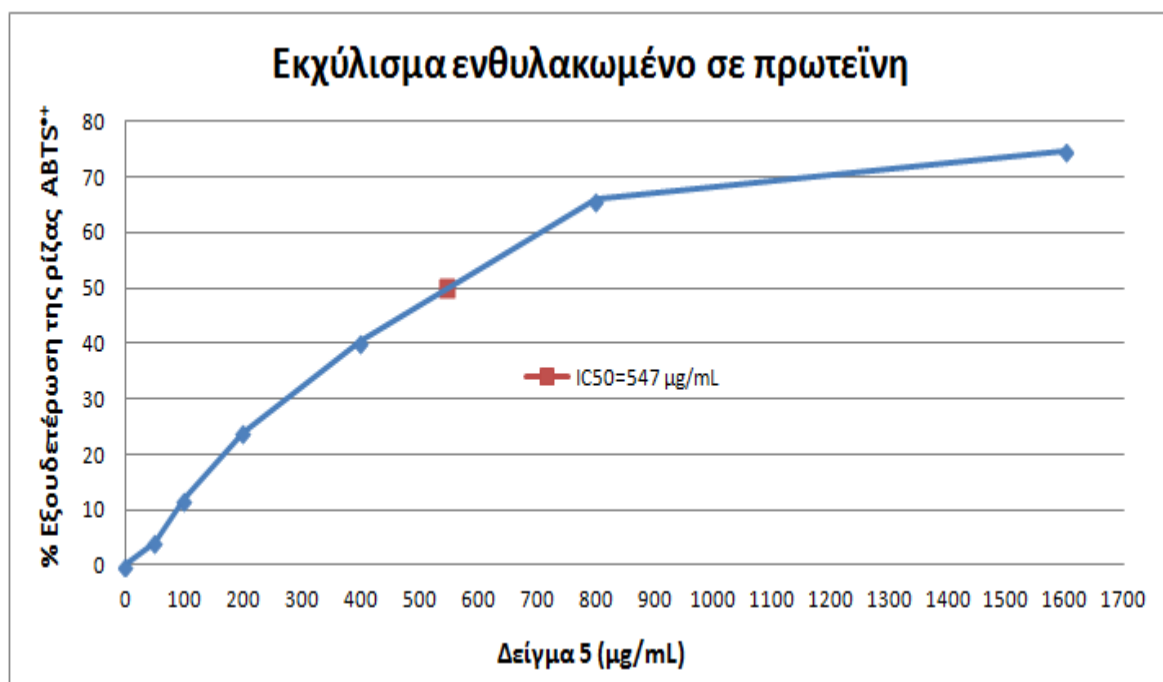
Γράφημα 2: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 2. IC₅₀ = 450±36 μg/ml.



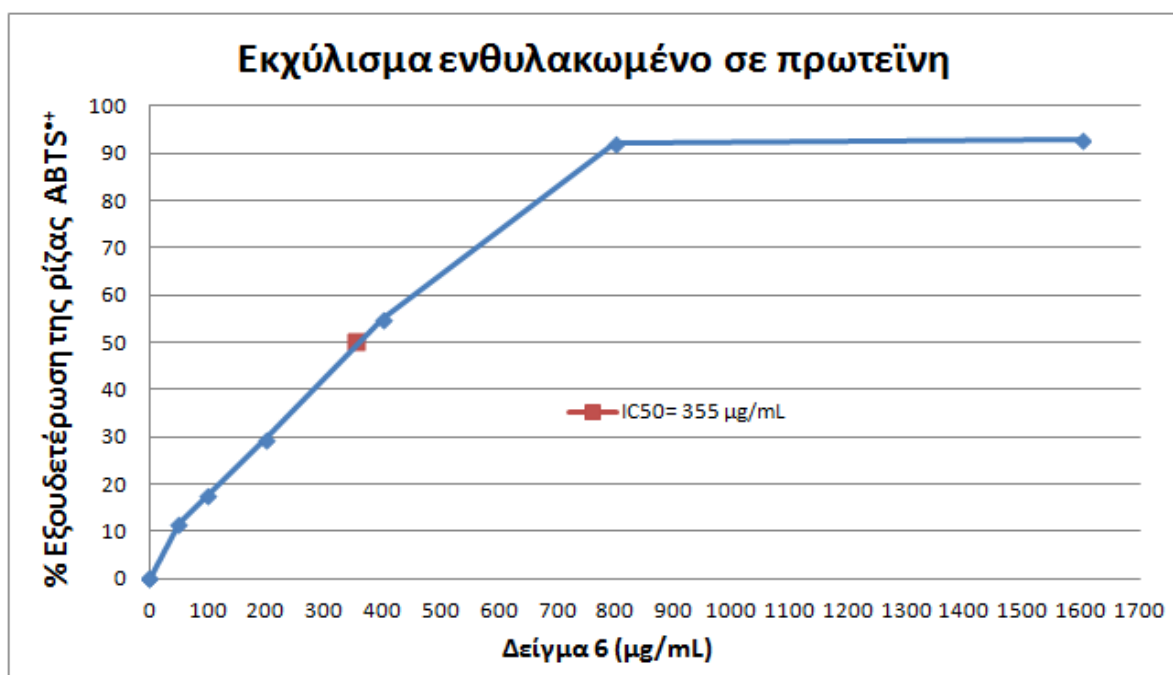
Γράφημα 3: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 3. IC₅₀ = 530±37 μg/ml.



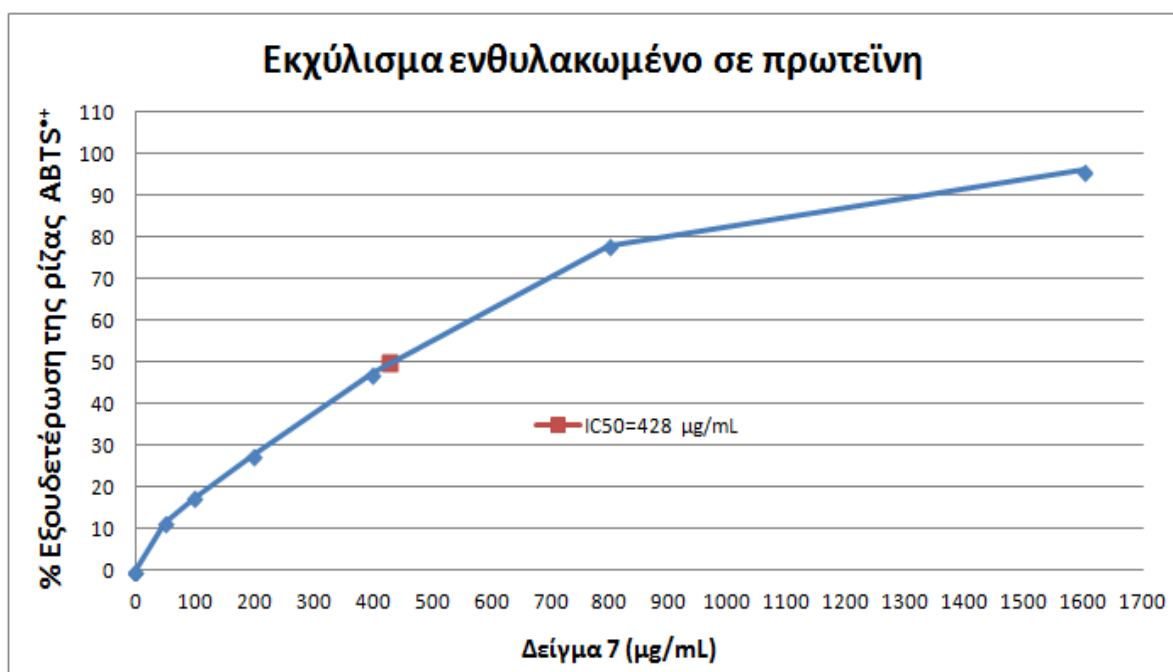
Γράφημα 4: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 4. IC₅₀ = 500±45 μg/ml.



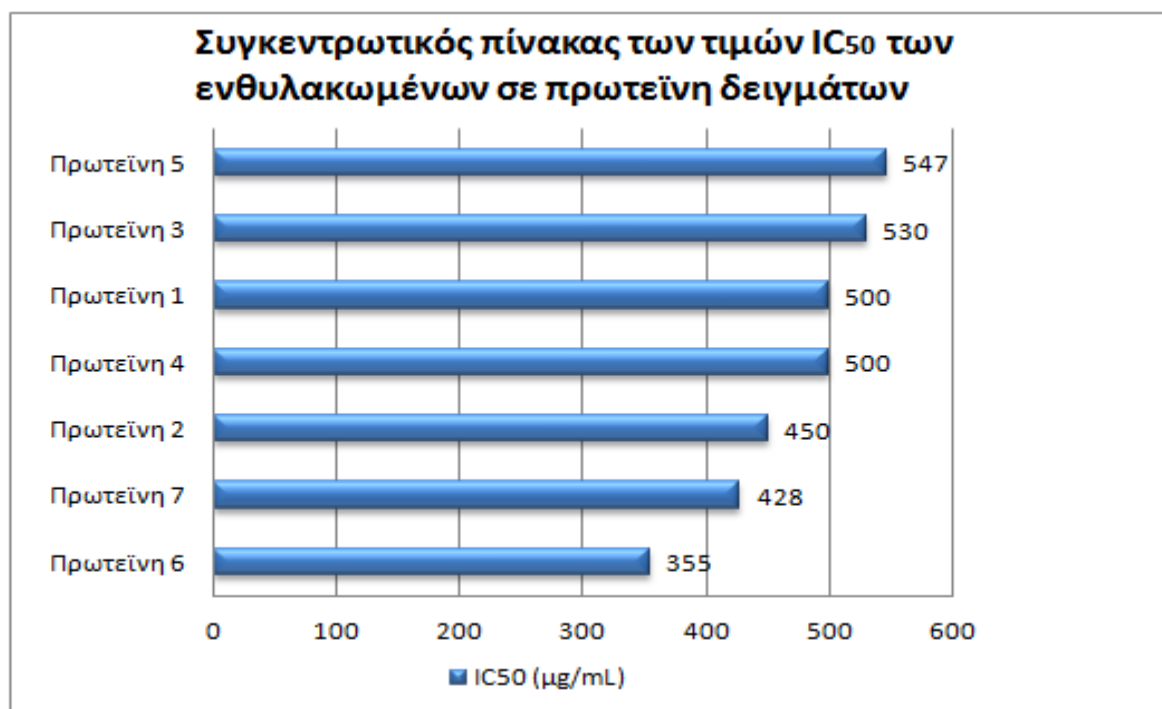
Γράφημα 5: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 5. IC₅₀ = 547±16 μg/ml.



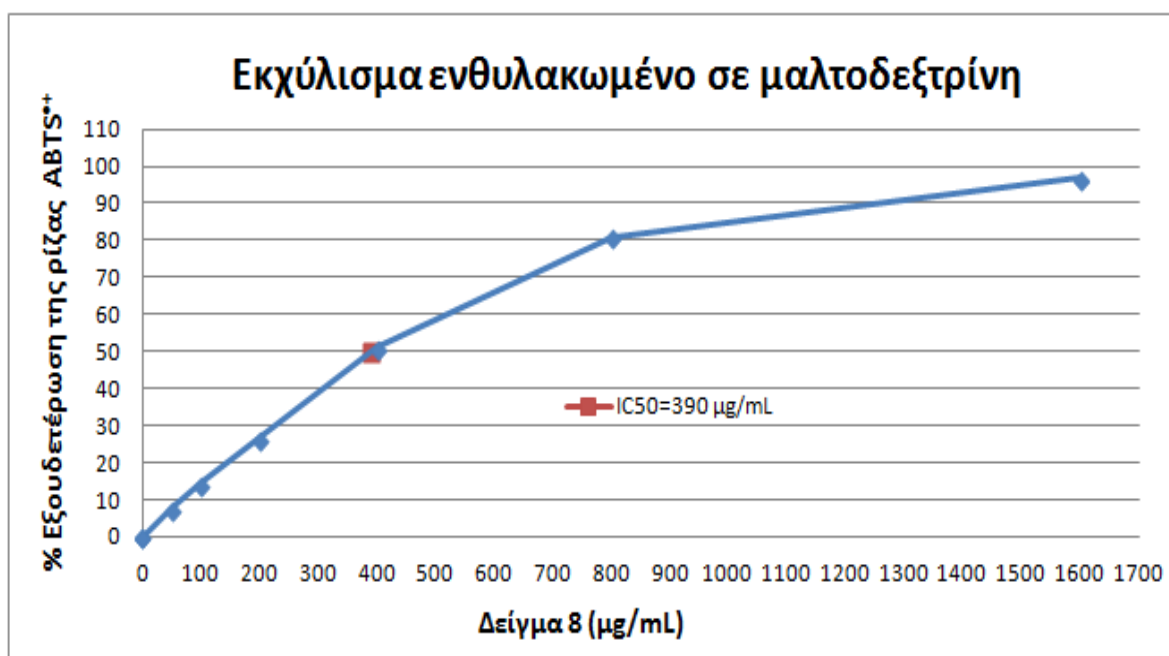
Γράφημα 6: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 6. IC₅₀ = 355±14 µg/ml.



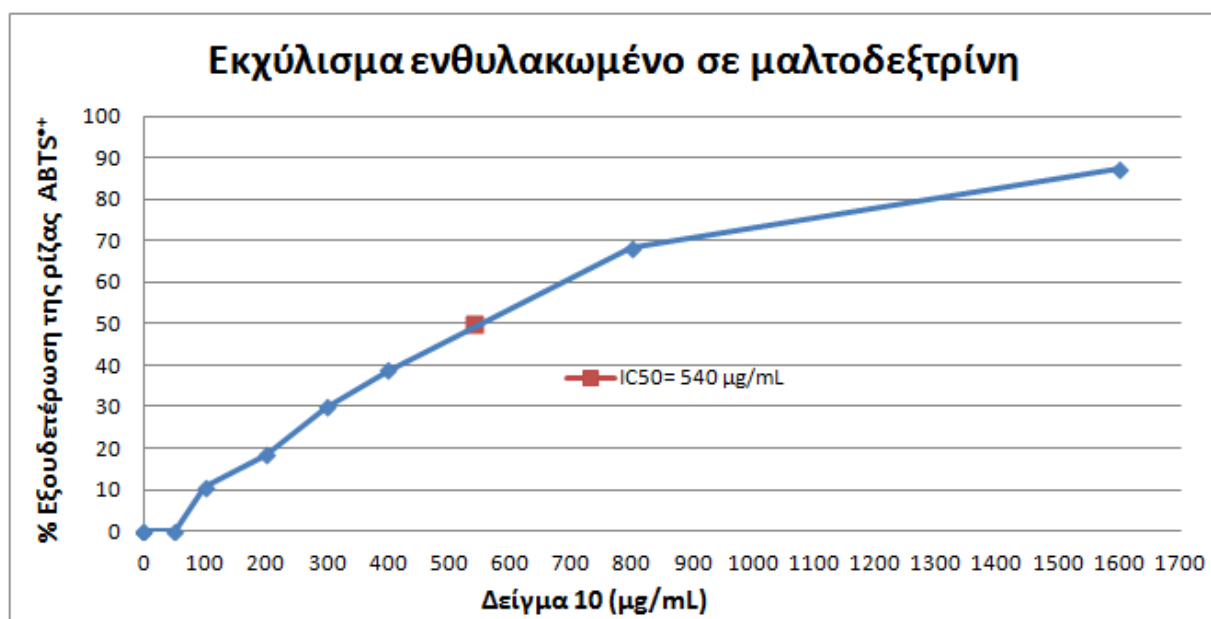
Γράφημα 7: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 7. IC₅₀ = 428±26 µg/ml.



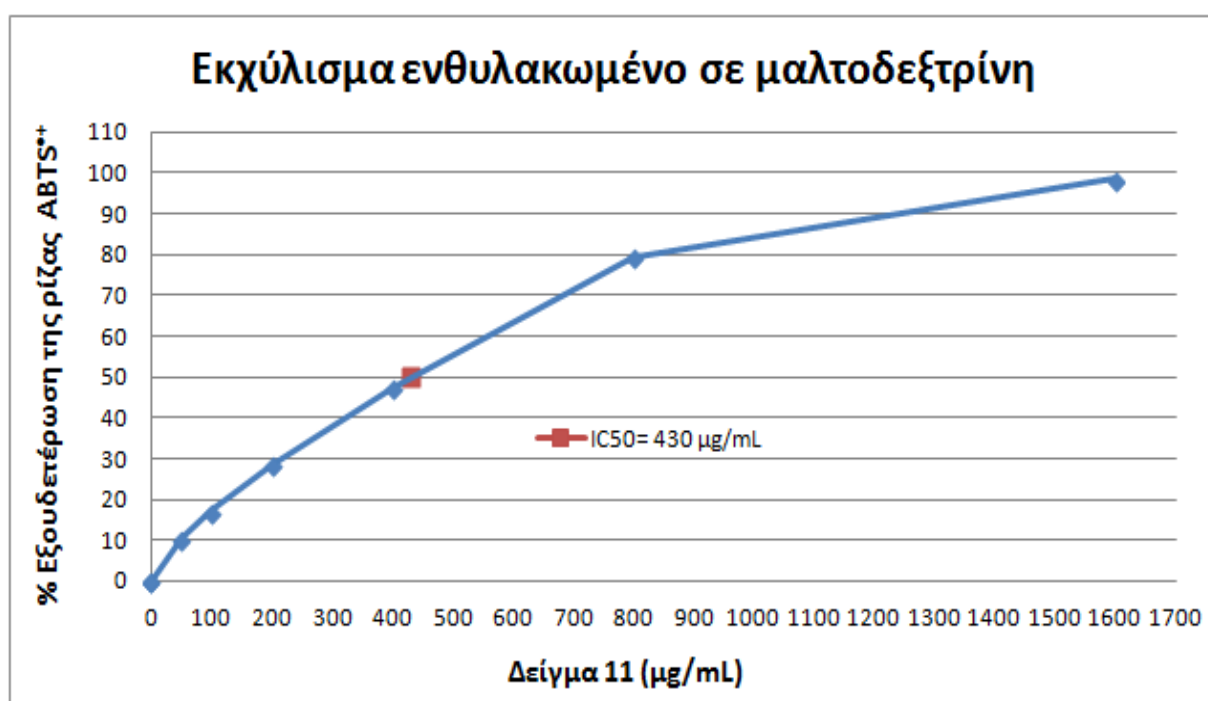
Γράφημα 8: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} των ενθυλακωμένων σε πρωτεΐνη δειγμάτων.



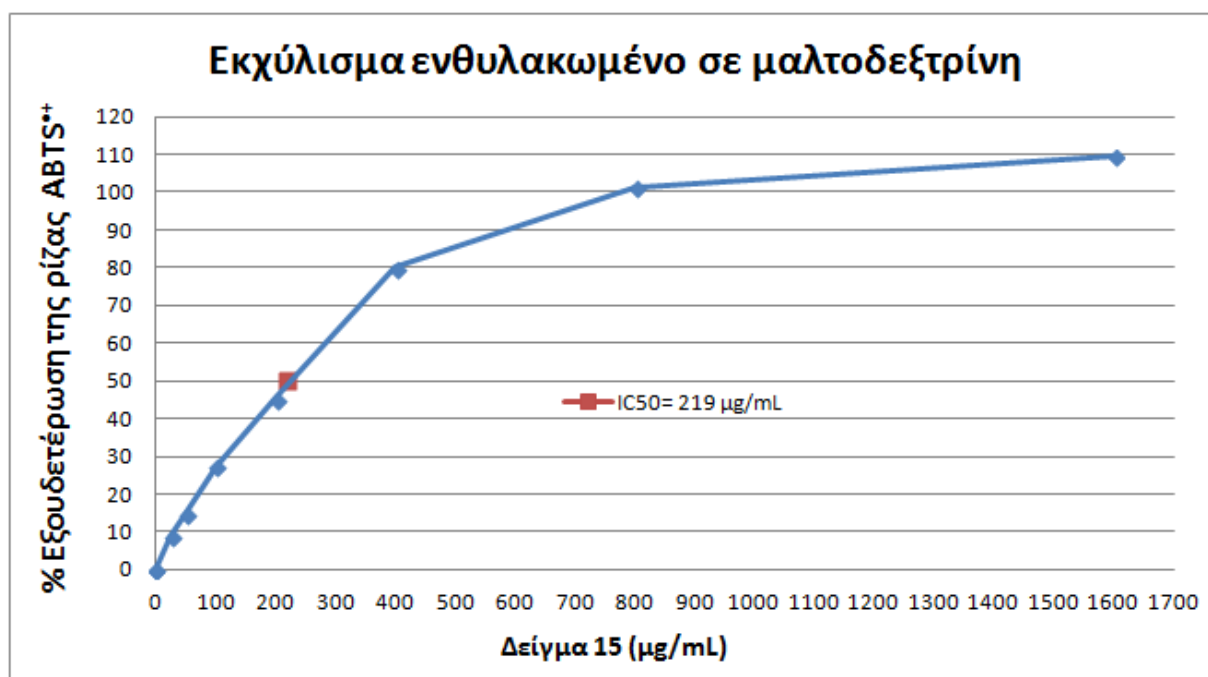
Γράφημα 9: Η % δέσμευση της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ από το δείγμα 8. $IC_{50} = 390 \pm 39$ µg/ml.



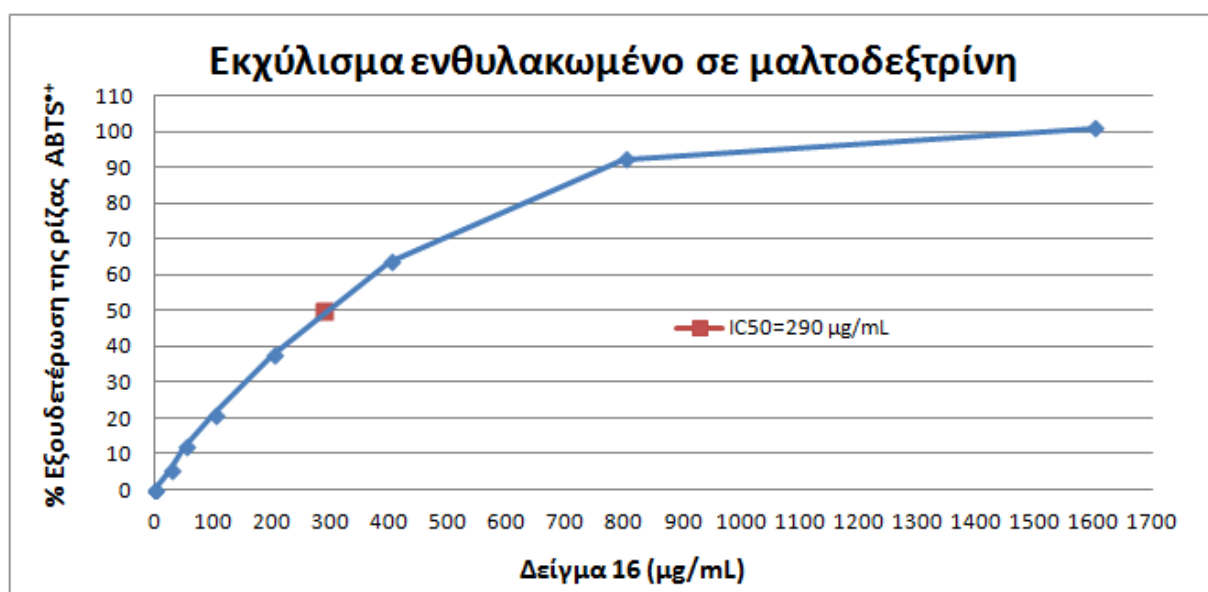
Γράφημα 10: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 10. IC₅₀ = 540±38 μg/ml.



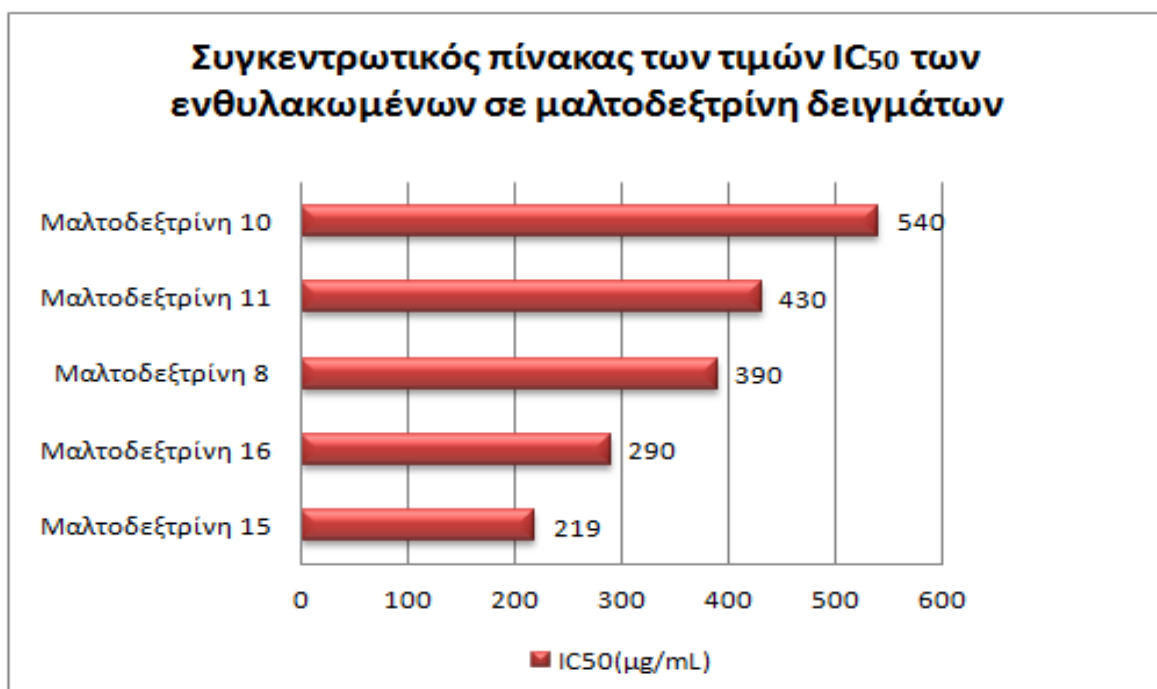
Γράφημα 11: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 11. IC₅₀ = 430±17 μg/ml.



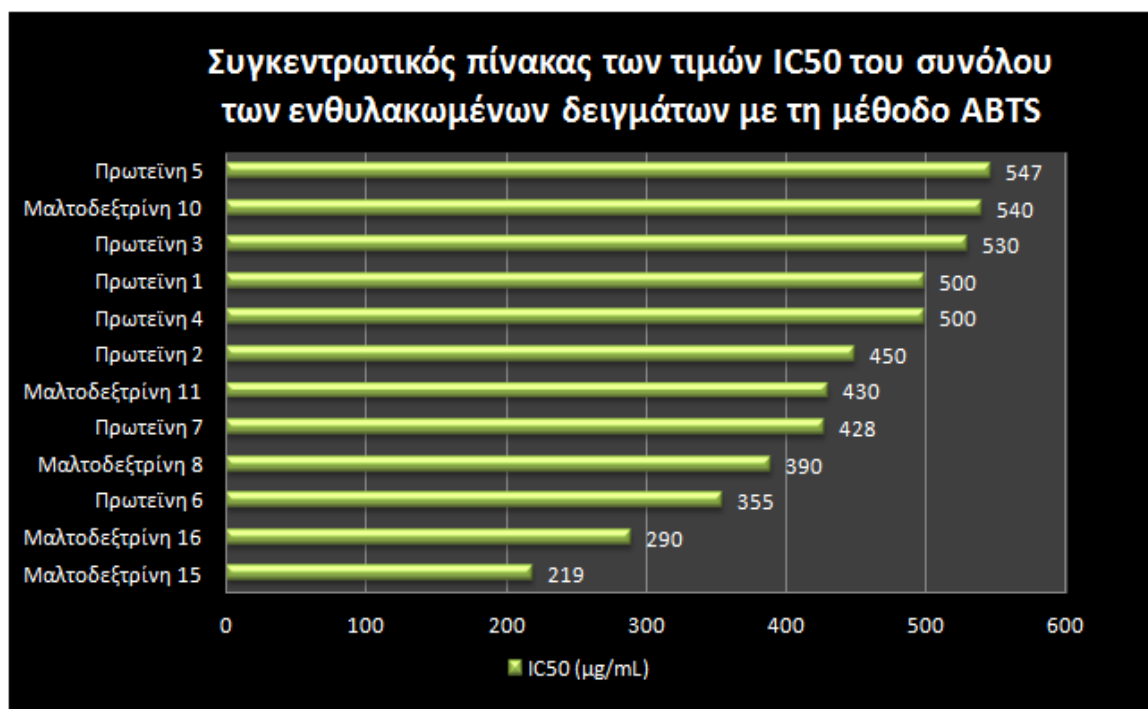
Γράφημα 12: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 15. IC₅₀ = 219±24 μg/ml.



Γράφημα 13: Η % δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα 16. IC₅₀ = 290±9 μg/ml.



Γράφημα 14: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} των ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη δειγμάτων.



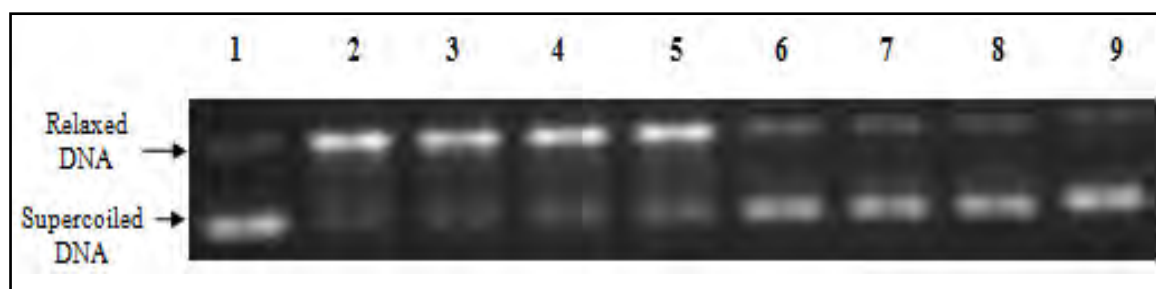
Γράφημα 15: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} του συνόλου των ενθυλακωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο ABTS.

Να σημειωθεί πως τόσο η πρωτεΐνη τυρογάλακτος όσο και η μαλτοδεξτρίνη, ουσίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως ενθυλακωτικά μέσα, δεν παρουσίασαν δέσμευση της ρίζας ABTS^{•+} όπως αυτό ελέγχθηκε από την απορρόφησή, στα 730 nm και επομένως δεν επηρέασαν τις τιμές των μετρήσεων που παρουσιάστηκαν παραπάνω.

4.2. Αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων έναντι της επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Συνολικά μελετήθηκαν 12 δείγματα από απόβλητα ελαιοτριβείου τα οποία ήταν ενθυλακωμένα υπό διαφορετικές συνθήκες σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Τα δείγματα 3, 4, 5, 6, 8, 10 και 16 εξετάσθηκαν στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1600 και 3200 µg/ml. Τα δείγματα 7, 11 και 15 εξετάσθηκαν στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/ml. Τέλος, το δείγμα 1 εξετάσθηκε στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/ml, ενώ το δείγμα 2 στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400 και 800 µg/ml.

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώσουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 520±41 µg/ml έως 2250±180 µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα 2 με IC₅₀ ίσο με 520±41 µg/ml, ενώ το πιο ασθενές ήταν το δείγμα 10 με IC₅₀ ίσο με 2250±180 µg/ml. Στην παρακάτω εικόνα δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών ROO[•] από τα εξετασθέντα δείγματα.



Εικόνα 22: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: πλασμιδιακό DNA

Σειρά 2: πλασμιδιακό DNA + AAPH

Σειρά 3: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 50 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 100 µg/ml εκχυλίσματος

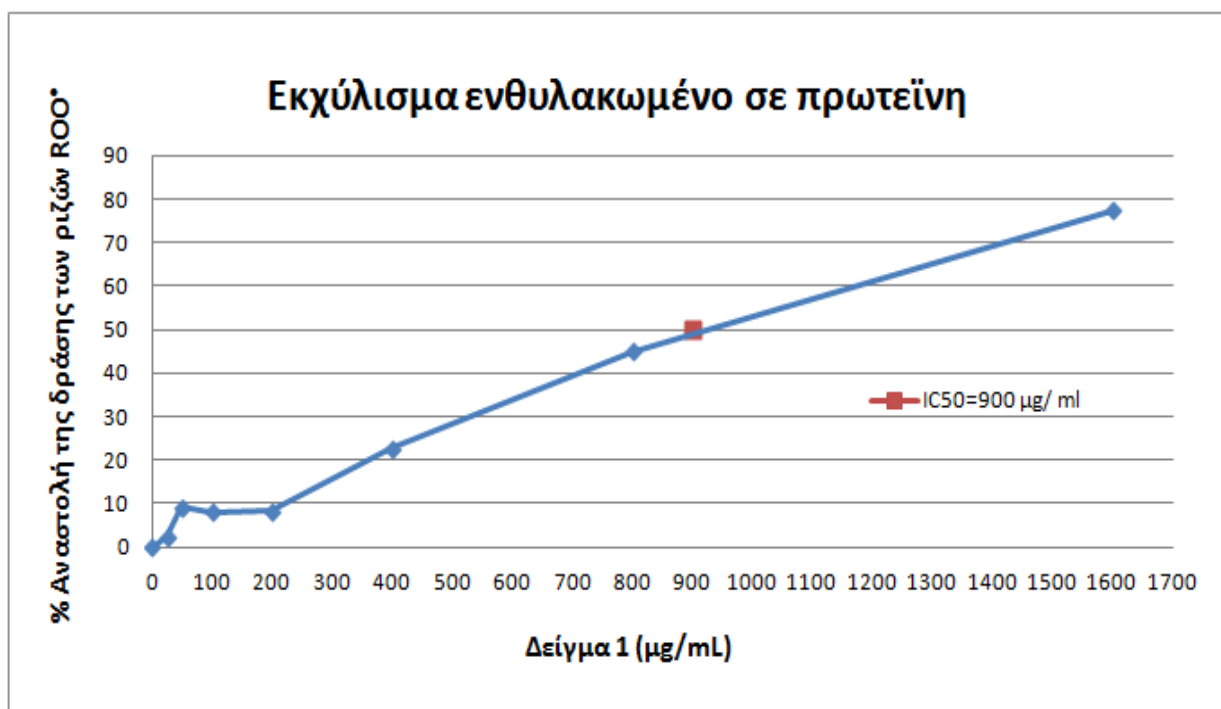
Σειρά 5: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 200 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 400 µg/ml εκχυλίσματος

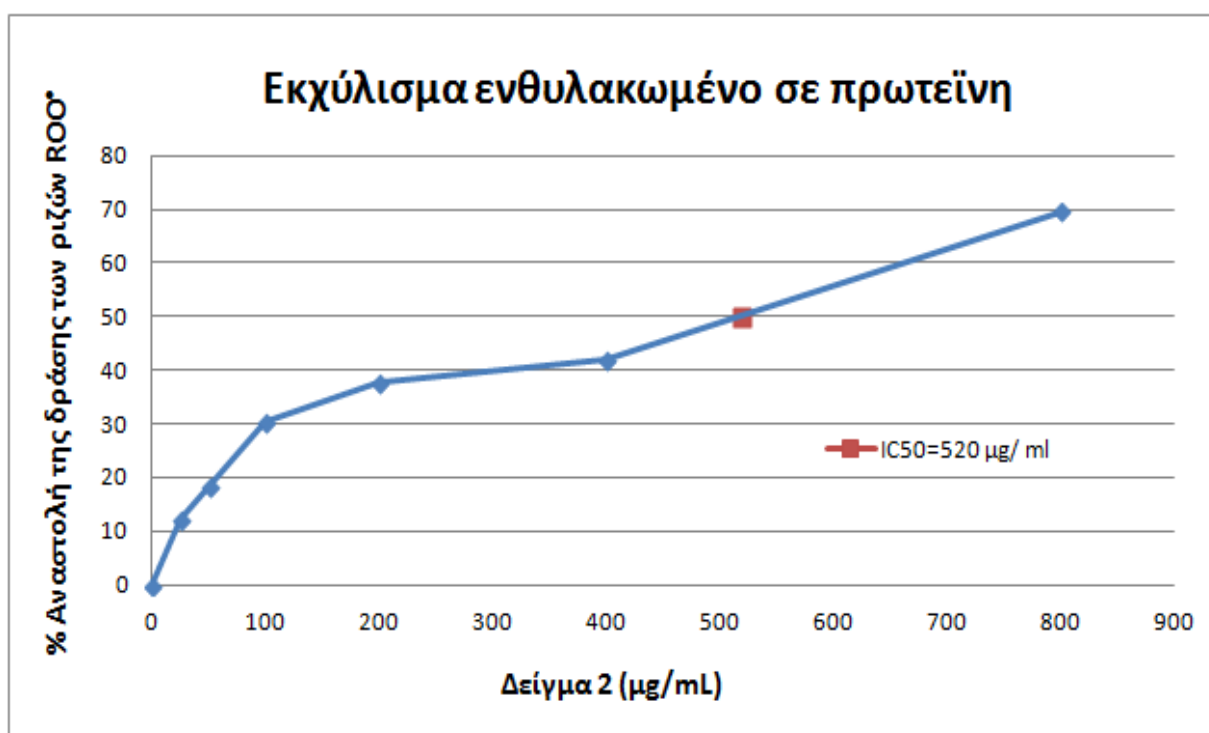
Σειρά 7: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 800 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: πλασμιδιακό DNA + AAPH + 1600 µg/ml εκχυλίσματος

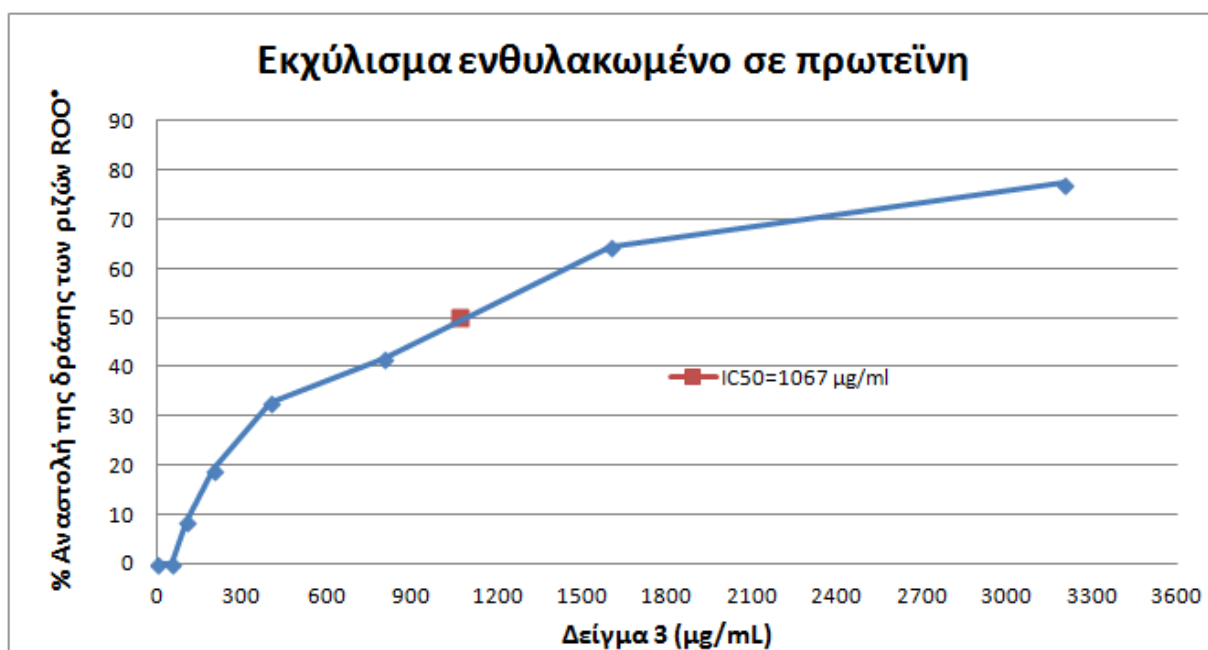
Σειρά 9: πλασμιδιακό DNA + 1600 µg/ml εκχυλίσματος



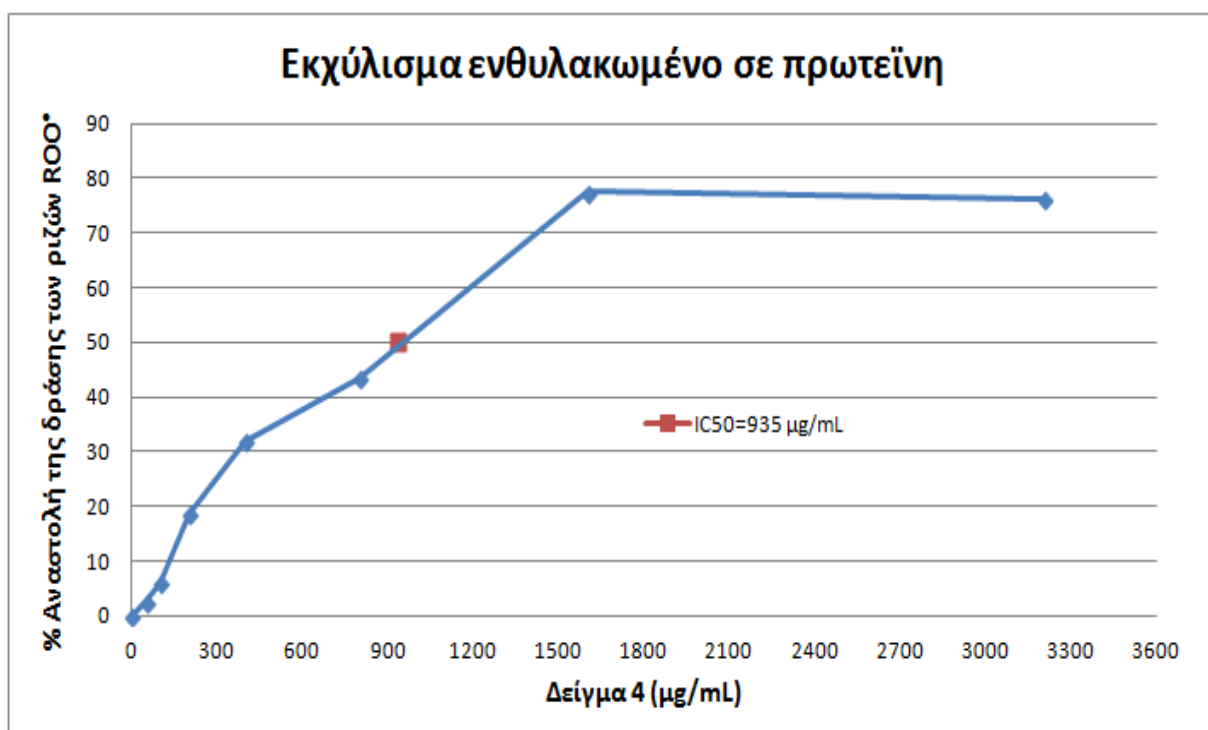
Γράφημα 16: Η % δέσμευση των ριζών ROO• από το δείγμα 1. IC₅₀ = 900 ± 45 μg/ml.



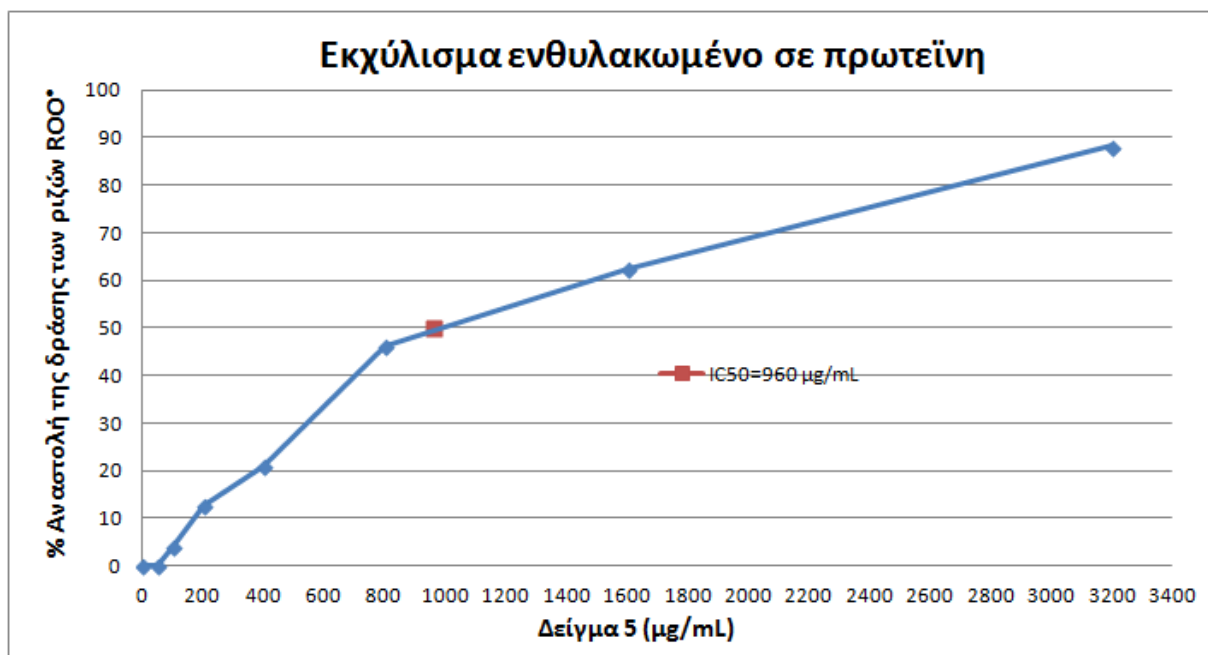
Γράφημα 17: Η % δέσμευση των ριζών ROO• από το δείγμα 2. IC₅₀ = 520 ± 41 μg/ml.



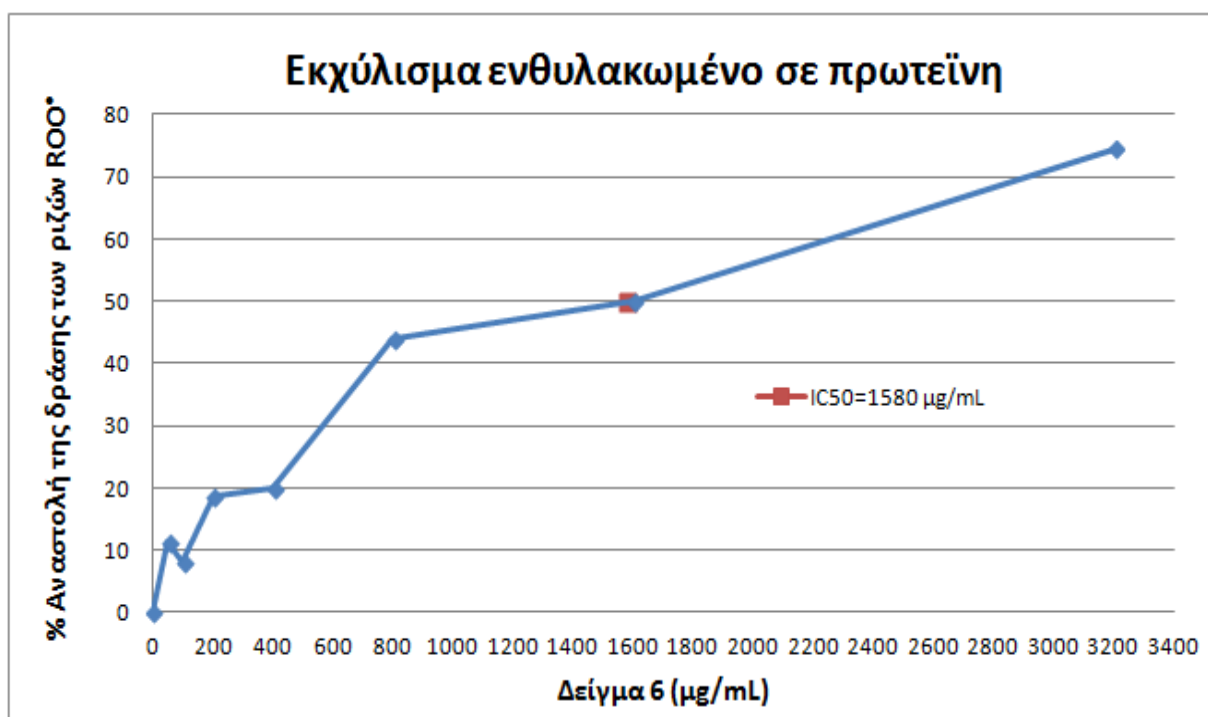
Γράφημα 18: Η % δέσμευση των ριζών ROO• από το δείγμα 3. IC₅₀ = 1067 ± 53 μg/ml.



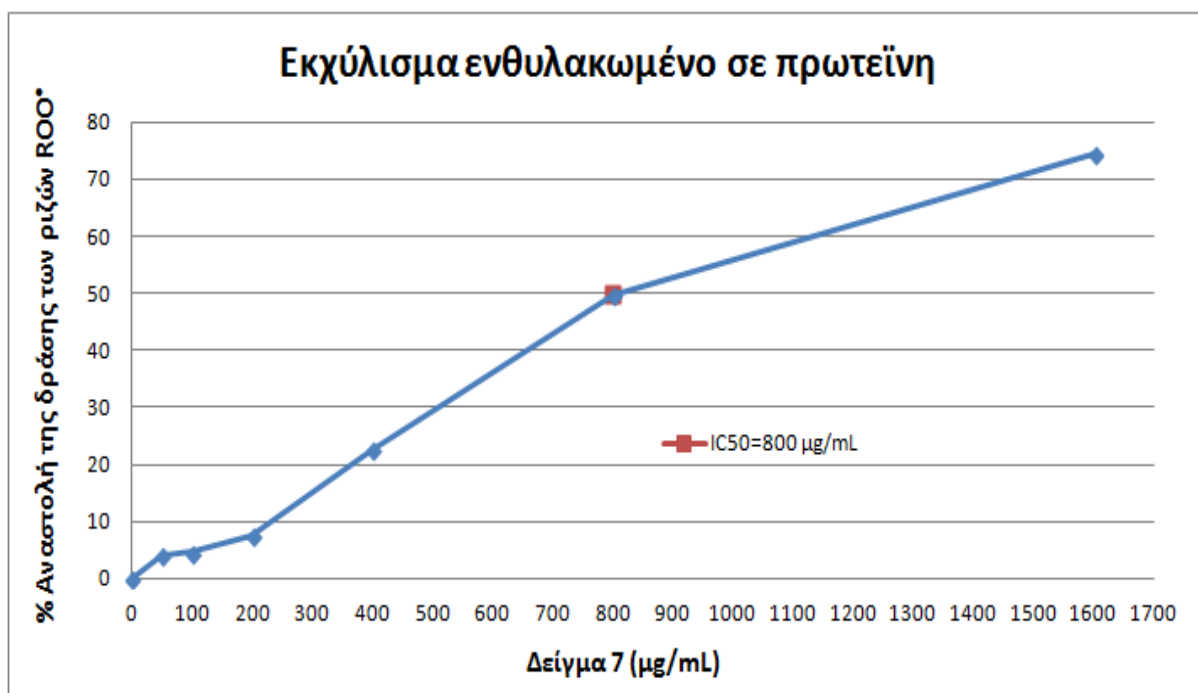
Γράφημα 19: Η % δέσμευση των ριζών ROO• από το δείγμα 4. IC₅₀ = 935 ± 84 μg/ml.



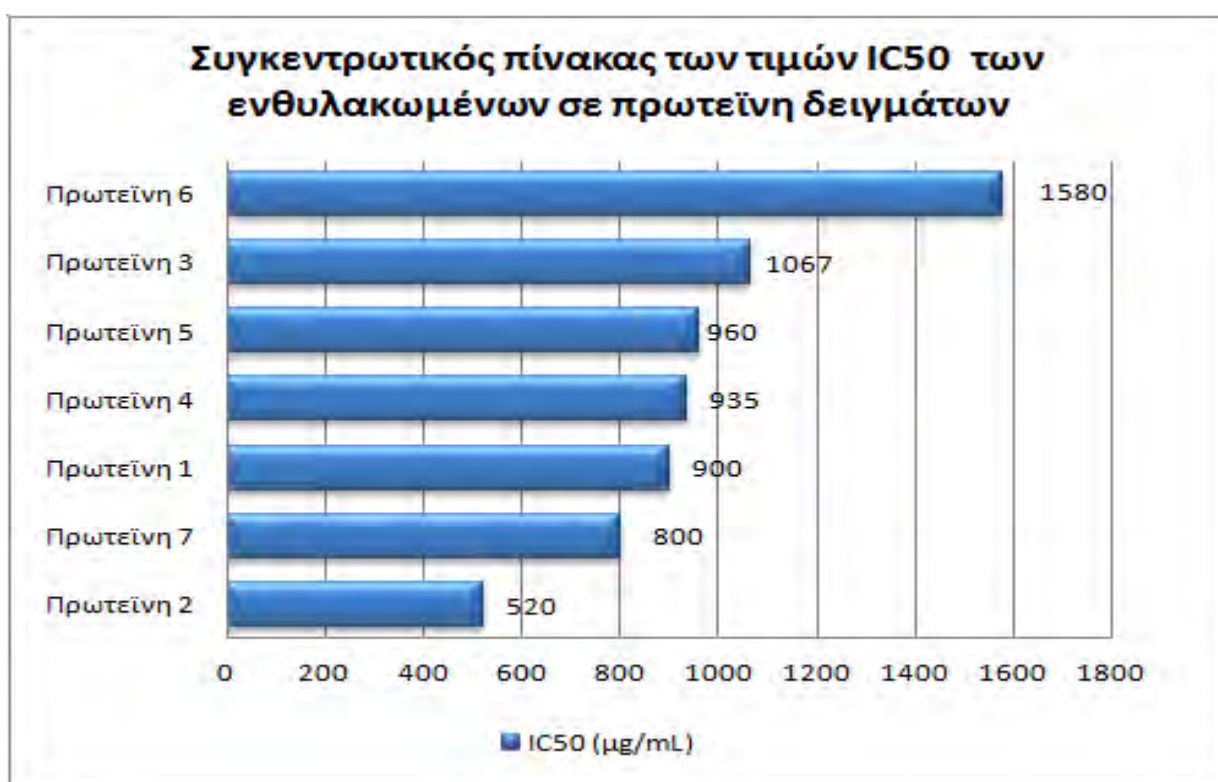
Γράφημα 20: Η % δέσμευση των ριζών ROO· από το δείγμα 5. $IC_{50} = 960 \pm 57 \mu\text{g/ml}$.



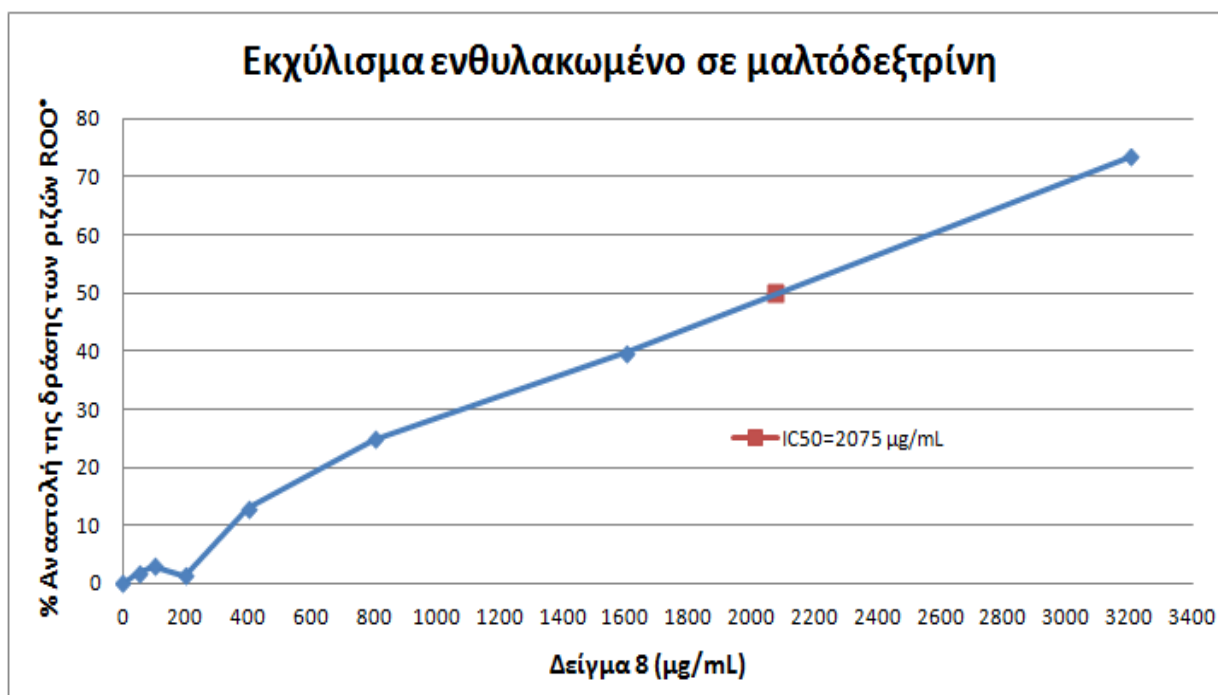
Γράφημα 21: Η % δέσμευση των ριζών ROO· από το δείγμα 6. $IC_{50} = 1580 \pm 63 \mu\text{g/ml}$.



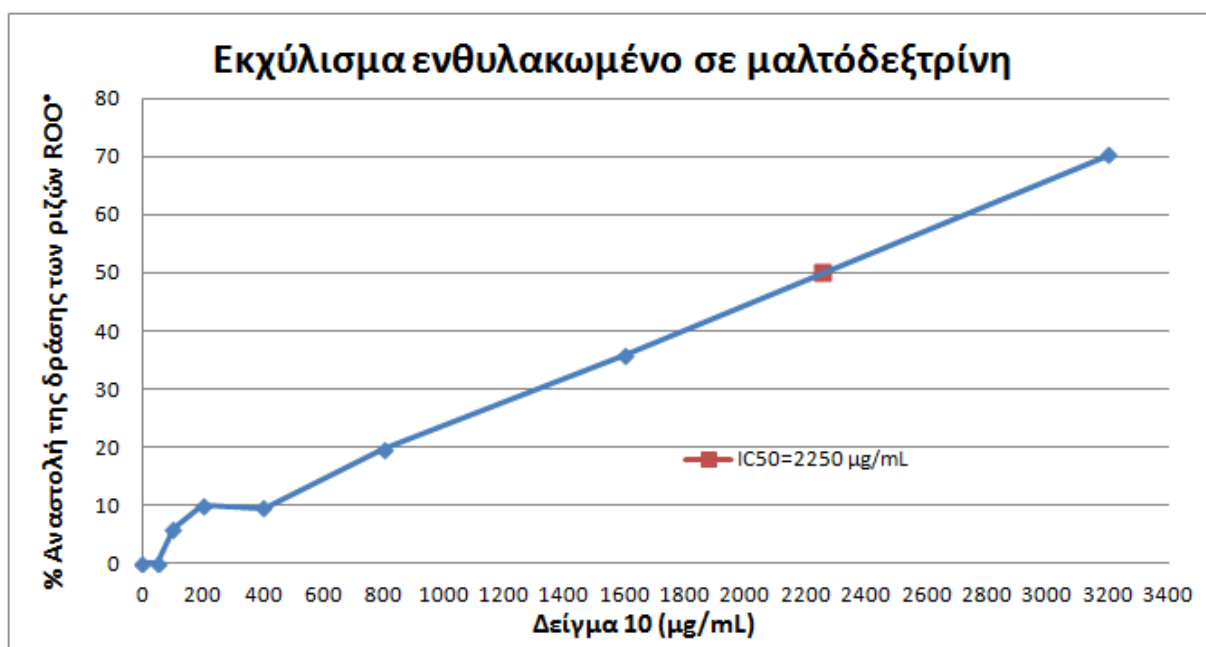
Γράφημα 22: Η % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 7. IC₅₀ = 800 ± 88 µg/ml.



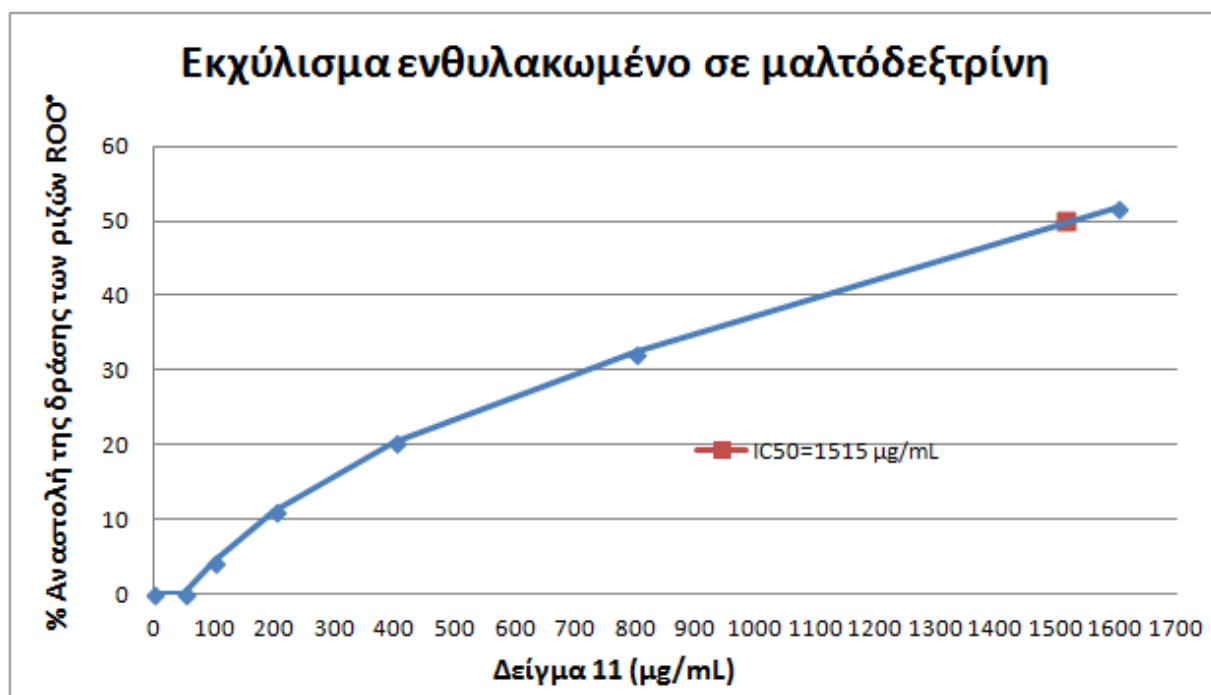
Γράφημα 23: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ των ενθυλακωμένων σε πρωτεΐνη δειγμάτων.



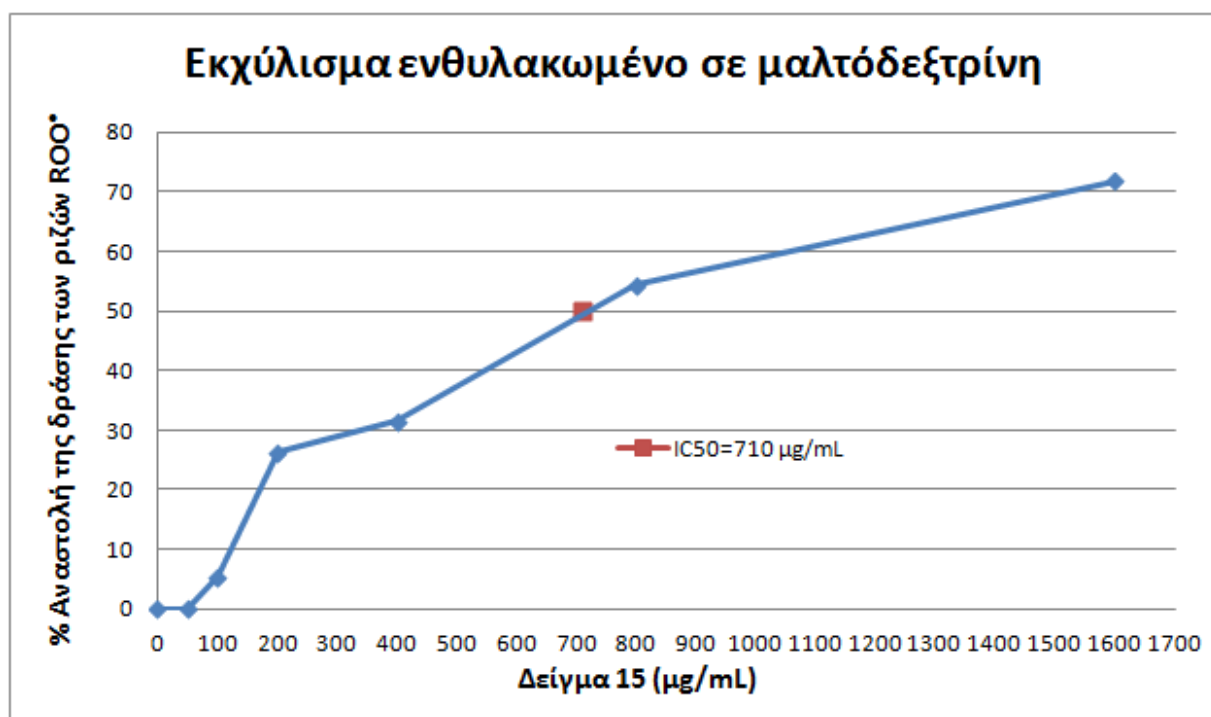
Γράφημα 24: Η % δέσμευση των ριζών ROO* από το δείγμα 8. IC₅₀ = 2075 ± 103 μg/ml.



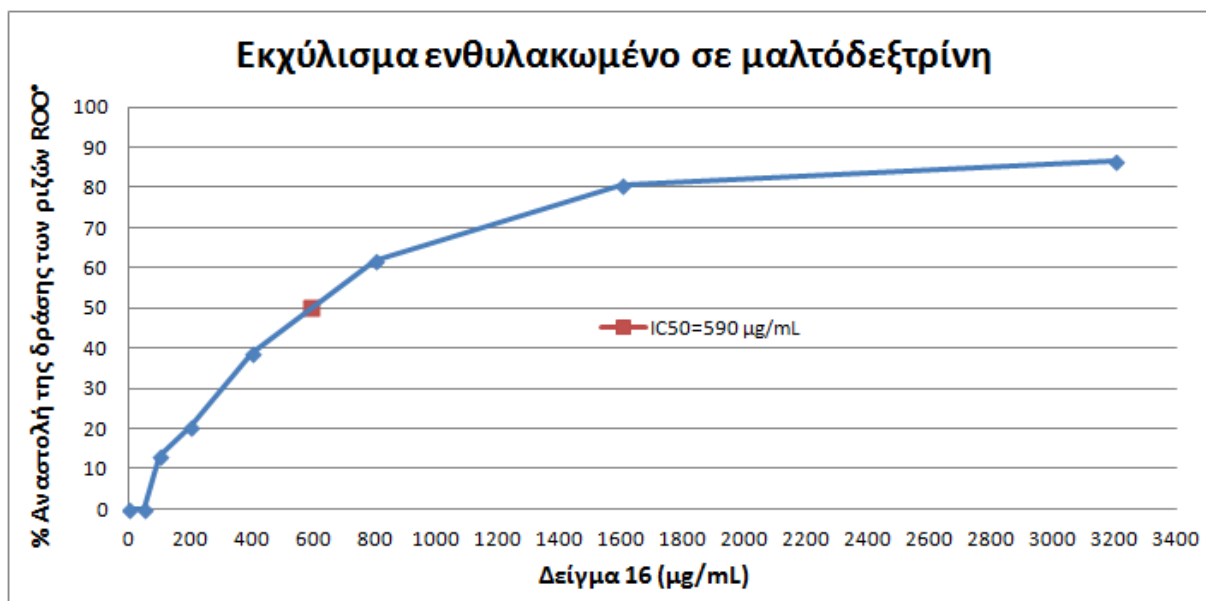
Γράφημα 25: Η % δέσμευση των ριζών ROO* από το δείγμα 10. IC₅₀ = 2250 ± 180 μg/ml.



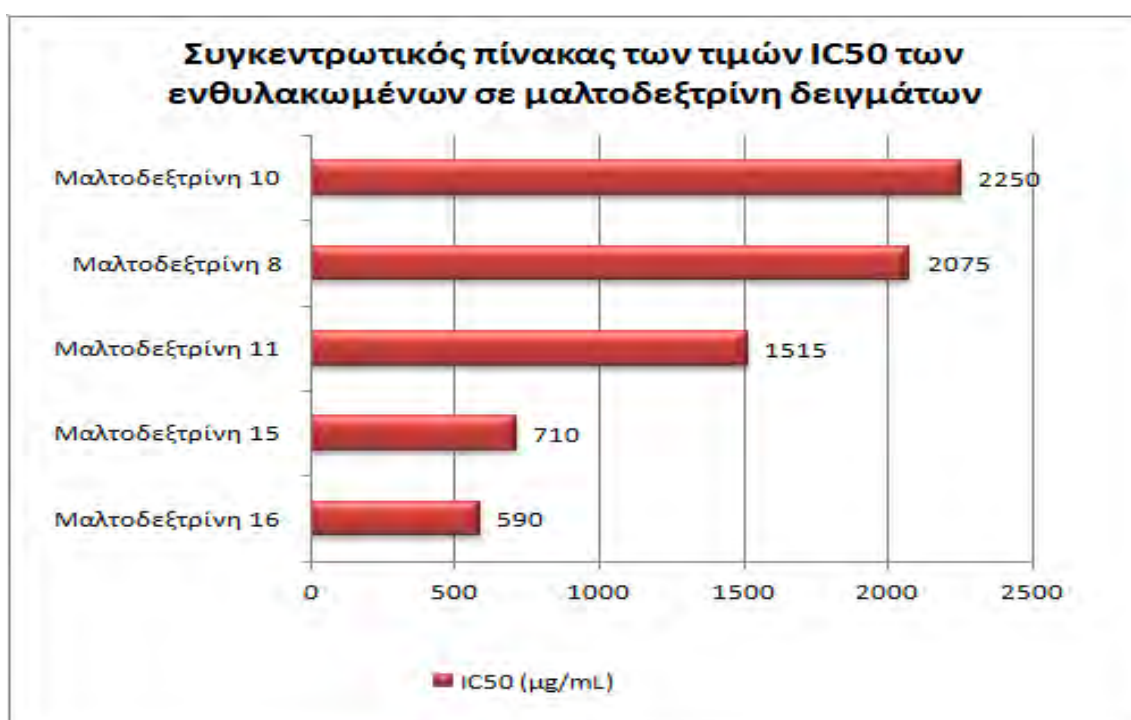
Γράφημα 26: Η % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 11. IC₅₀ = 1515 ± 136 μg/ml.



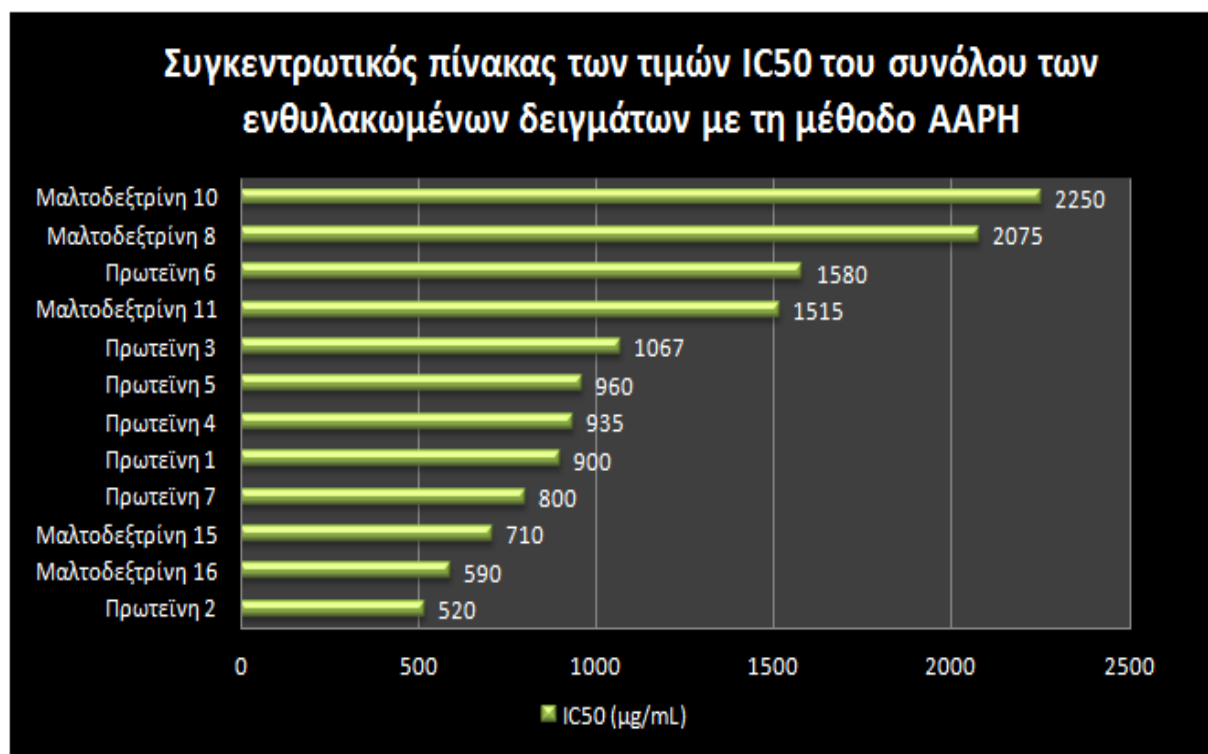
Γράφημα 27: Η % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 15. IC₅₀ = 710 ± 78 μg/ml.



Γράφημα 28: Η % δέσμευση των ριζών ROO[•] από το δείγμα 16. IC₅₀ = 590 ± 65 μg/ml.



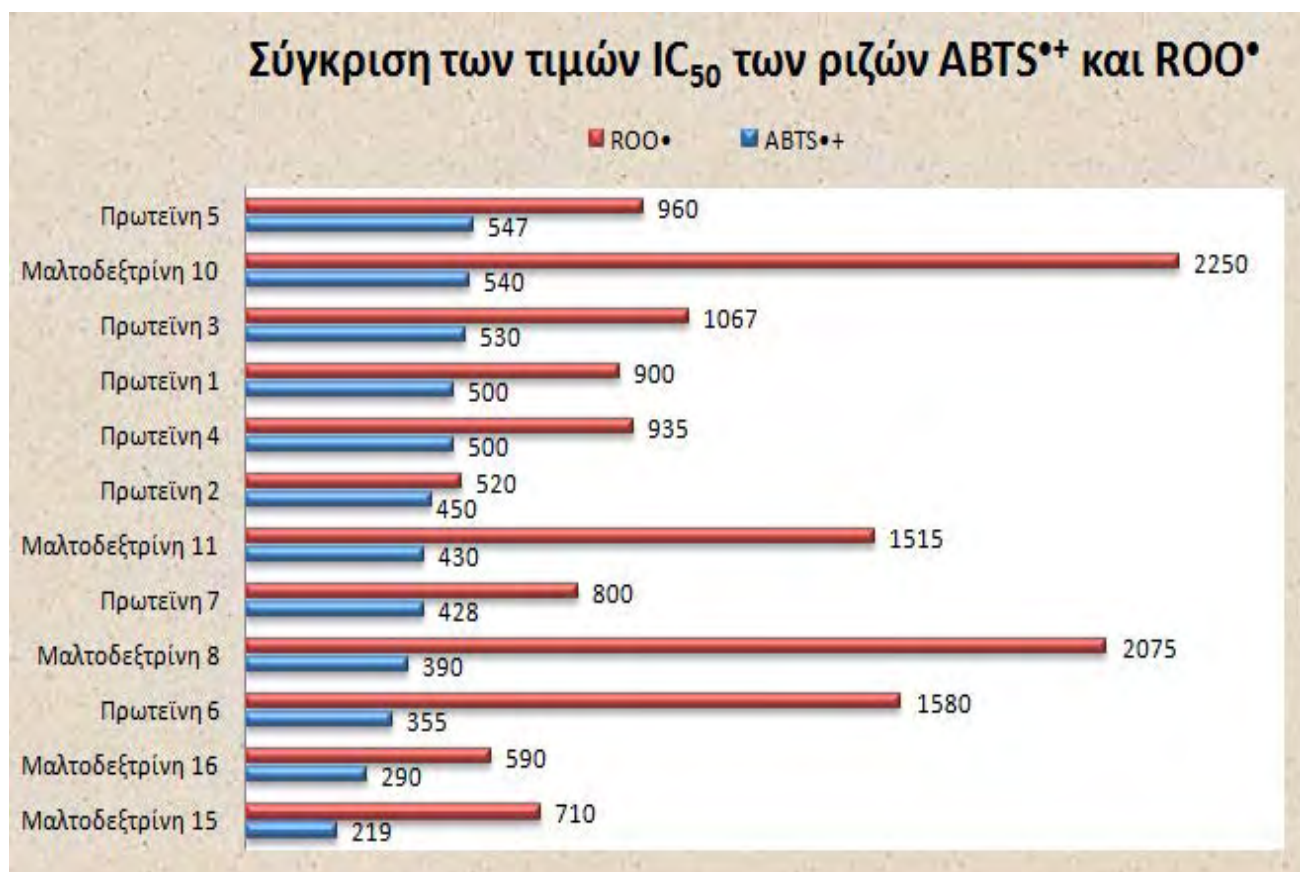
Γράφημα 29: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ των ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη δειγμάτων.



Γράφημα 30: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀ του συνόλου των ενθυλακωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο ΑΑΡΗ.

4.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ABTS^{•+} και ROO[•]

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το παρακάτω γράφημα διαπιστώνουμε ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων δειγμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και αρκετές αποκλίσεις.



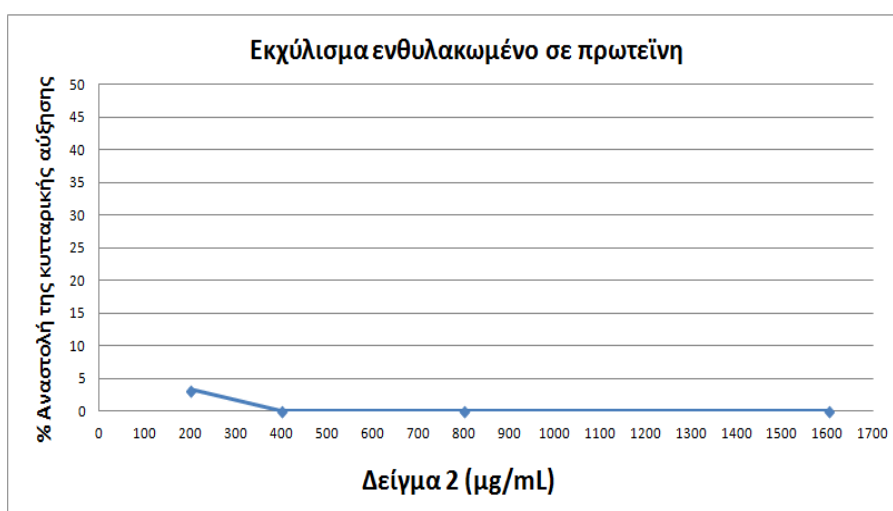
Γράφημα 31: Απεικόνιση των τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους.

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δύο μεθόδων με το εύρος των τιμών IC₅₀ να κυμαίνεται από 219±24 μg/ml έως 2250±180 μg/ml.

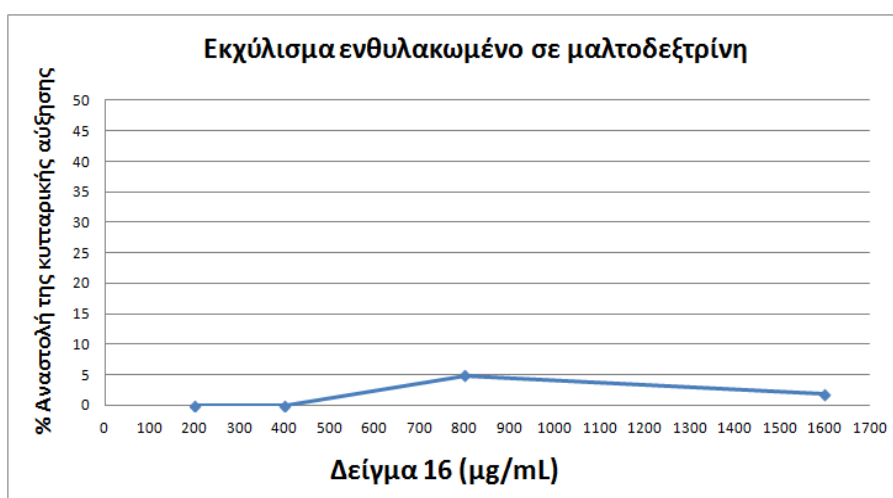
4.4. Αποτελέσματα της μεθόδου XTT

Τα δύο ισχυρότερα δείγματα, όπως αυτά προέκυψαν από τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας ($ABTS^{\bullet+}$ και ROO^{\bullet}), ελέγχθηκαν με τη μέθοδο XTT (καμπύλη τοξικότητας), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ήταν δυνατό να εισαχθούν στις επιθυμητές συγκεντρώσεις σε κυτταροκαλλιέργειες.

Τα δύο ισχυρότερα δείγματα (2 και 16) δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς EA.hy926 στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής (200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$).



Γράφημα 32: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης της κυτταρικής σειράς EA.hy926 από το δείγμα 2, το οποίο είναι ενθυλακωμένο σε πρωτεΐνη.

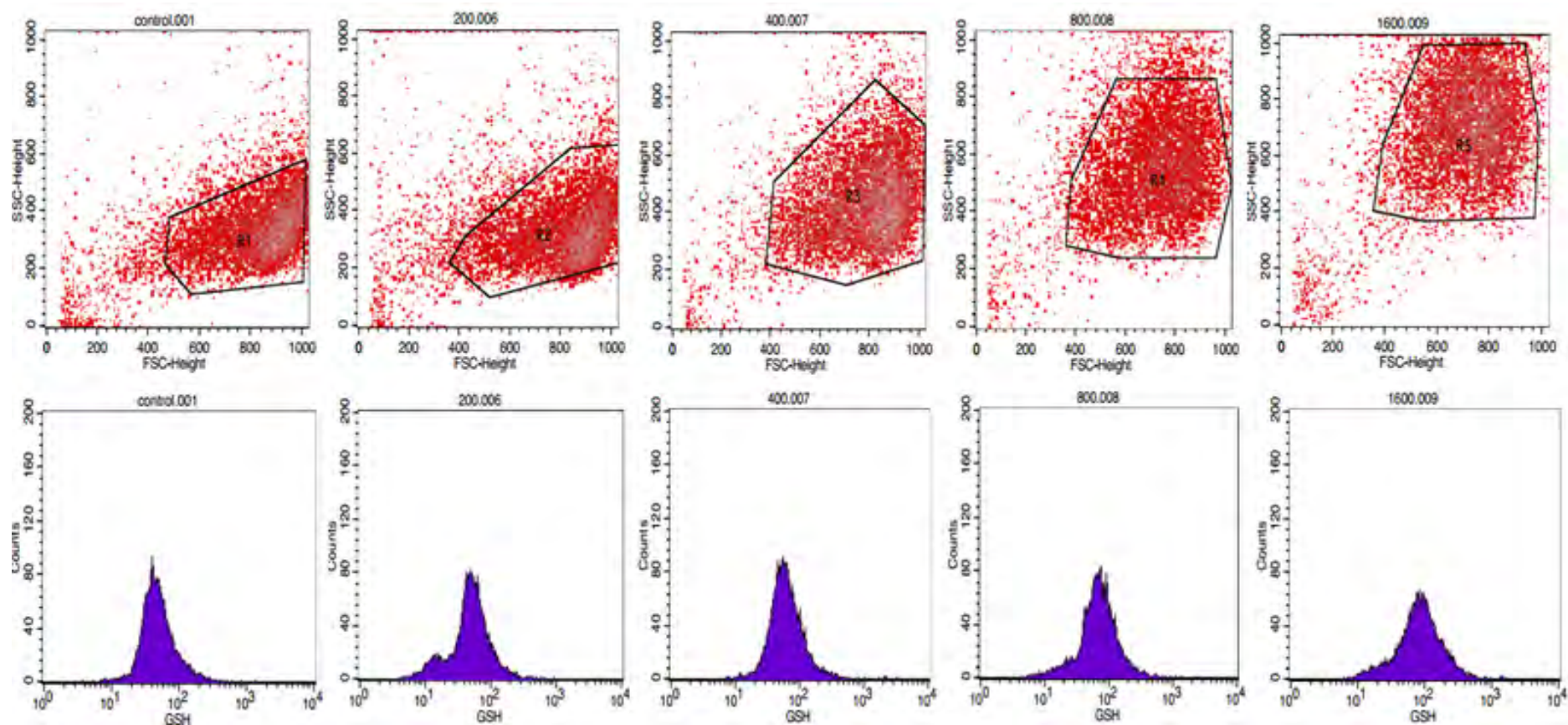


Γράφημα 33: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης της κυτταρικής σειράς EA.hy926 από το δείγμα 16, το οποίο είναι ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη.

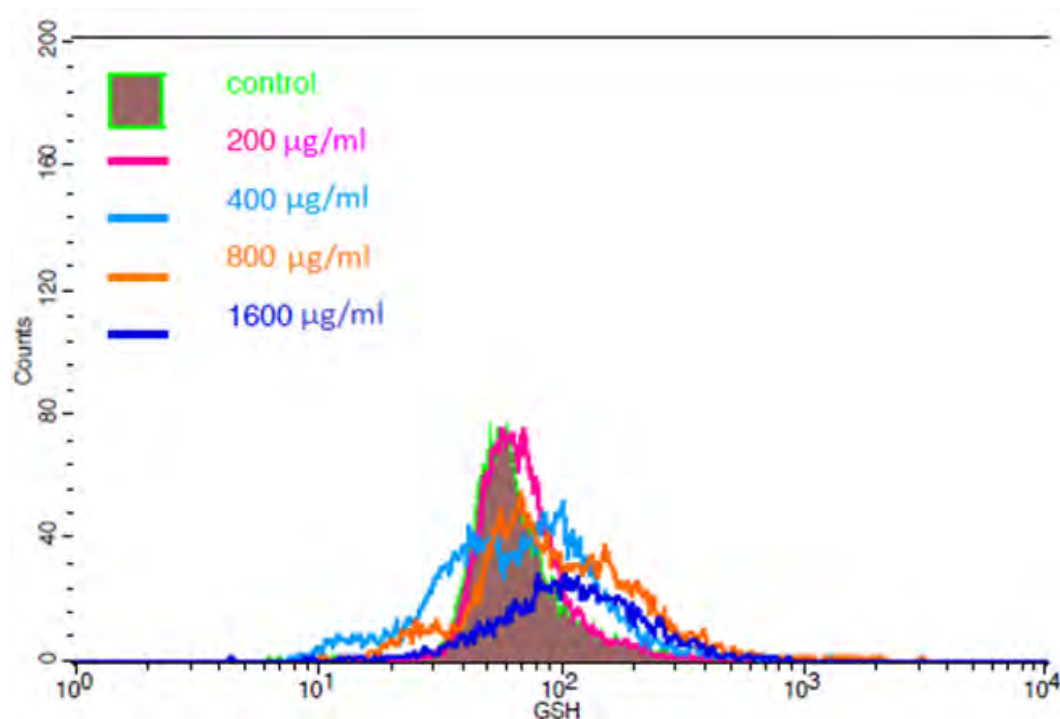
4.5. Αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από επώαση με τα δύο δραστικότερα δείγματα εκ του συνόλου των δώδεκα που εξετάστηκαν με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Στον πρώτο κύκλο πειραμάτων τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με το καθένα από τα δύο δείγματα σε συγκεντρώσεις 1600, 800, 400 και 200 $\mu\text{g/ml}$. Στο δεύτερο κύκλο πειραμάτων μετά την 24ωρη επώαση με το εκάστοτε δείγμα ακολουθούσε επιπλέον 1 ώρα επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH (0,3mM). Σε αυτόν το δεύτερο κύκλο πειραμάτων προσδιορίστηκε επίσης και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα όταν δεν είχε προηγηθεί προσθήκη κάποιου εκ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Τα πειράματα κάθε κύκλου πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν προκειμένου να έχουμε επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

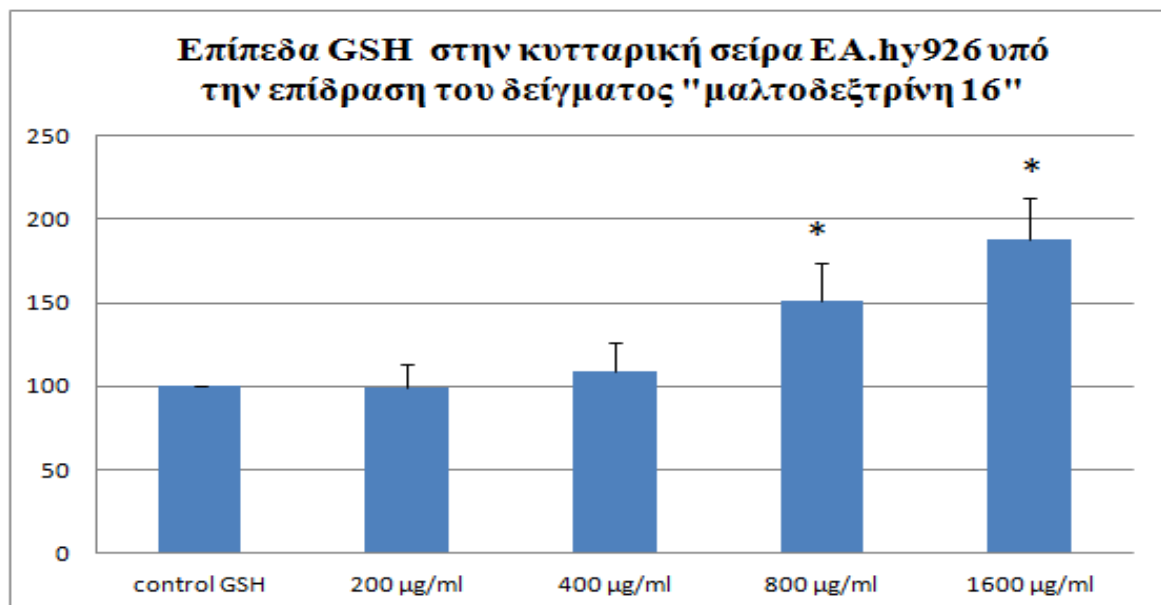
Όσον αφορά το δείγμα «Μαλτοδεξτρίνη 16» τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με το control 51% και 88% στα 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. (Γράφημα 35).



Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων γλουταθειόνης (κάτω σειρά) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τη χορήγηση του δείγματος «πρωτεΐνη 2».

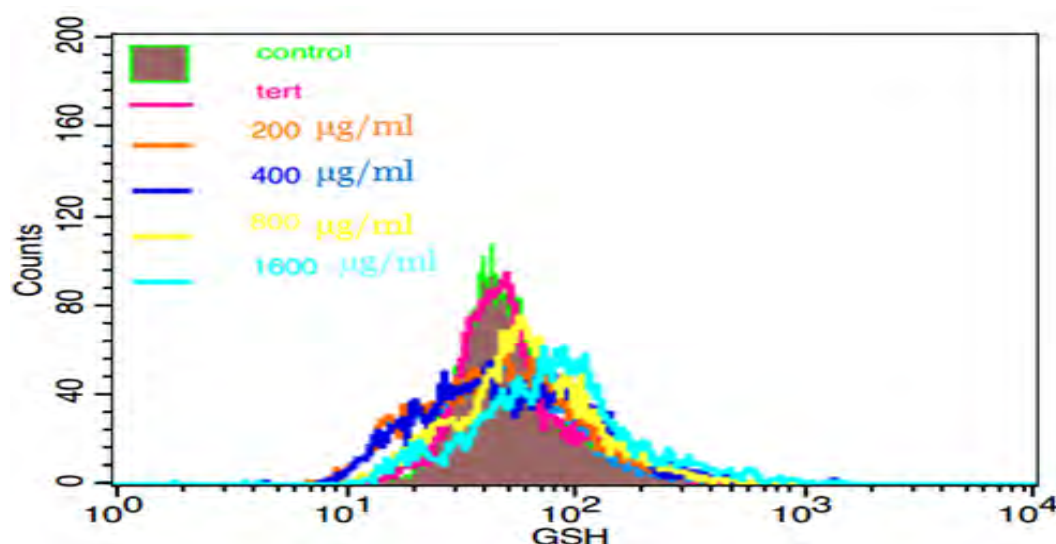


Γράφημα 34: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας Ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- απουσία *t*-BOOH.

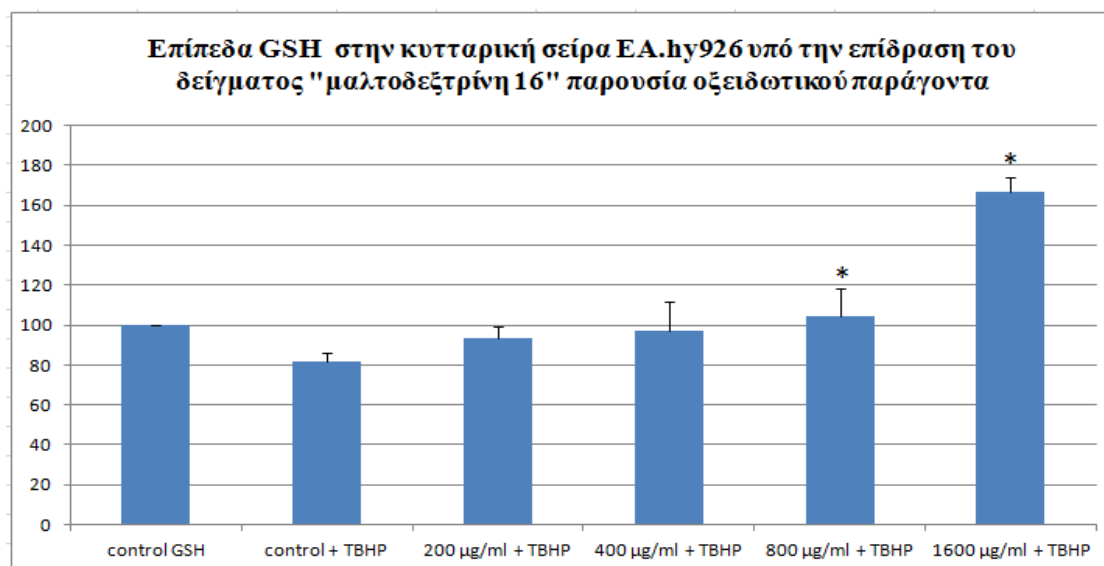


Γράφημα 35: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p < 0,05$)

Παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) τα επίπεδα της γλουταθειόνης μειώθηκαν κατά 19% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που είχε προηγηθεί χορήγηση του δείγματος σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων GSH κατά 14%, 19%, 28% και 104%, σε σχέση με το control t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (γράφημα 37).

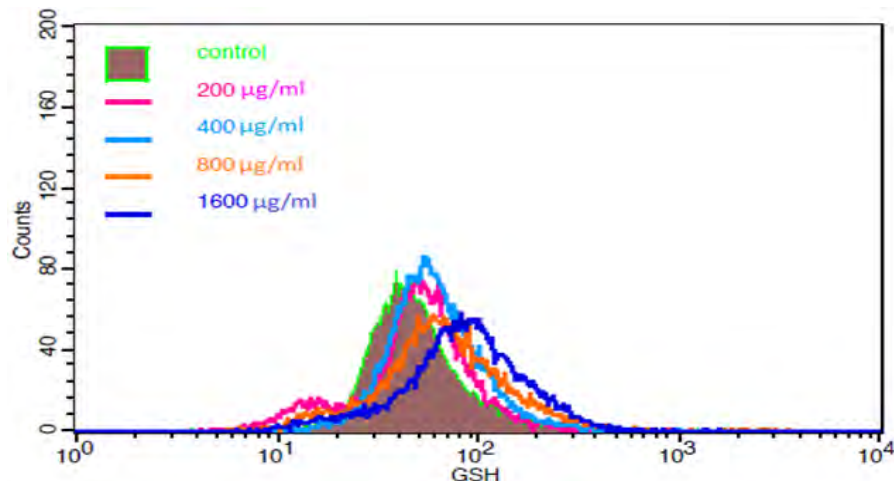


Γράφημα 36: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- παρουσία t-BOOH.

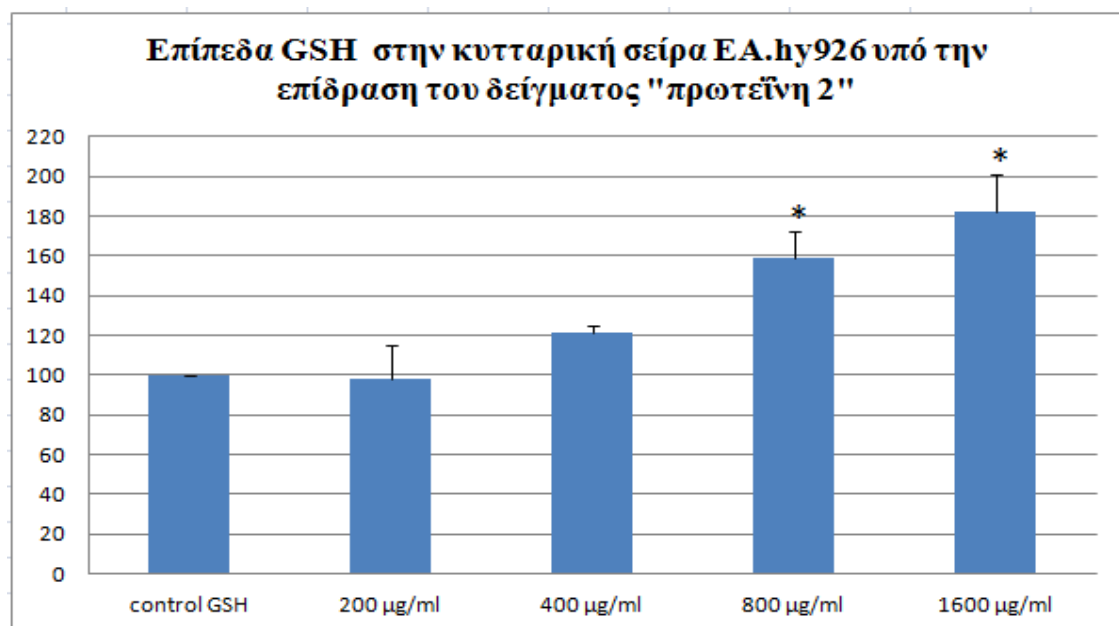


Γράφημα 37: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3 μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p < 0,05$)

Όσον αφορά το δείγμα «Πρωτεΐνη 2» τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα GSH απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρουσίασαν αύξηση σε σύγκριση με το control κατά 22%, 59% και 82% στα 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (Γράφημα 39).



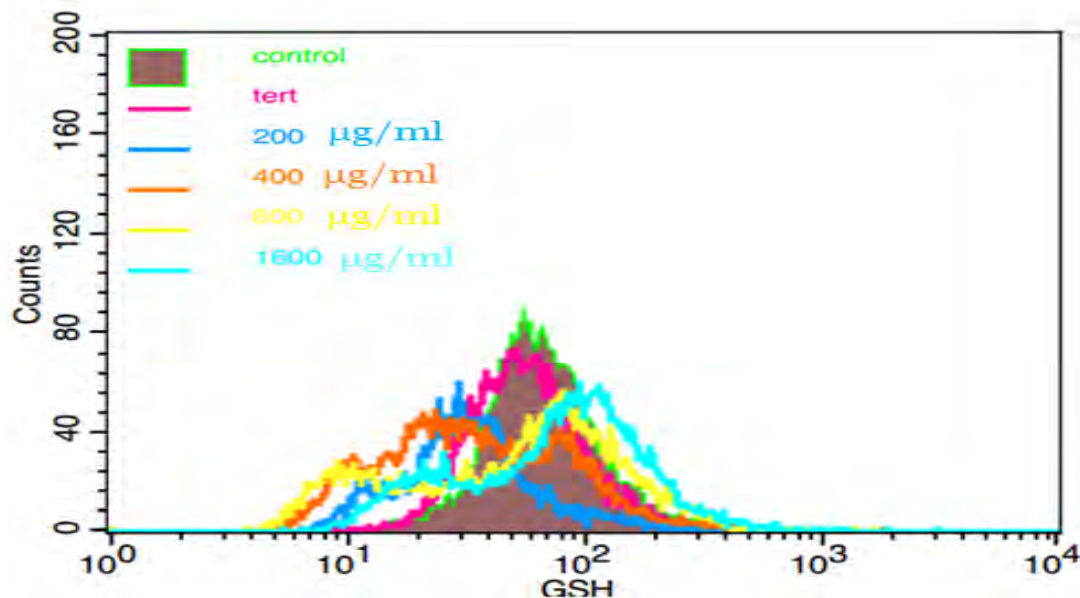
Γράφημα 38: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- Απουσία *t-BOOH*.



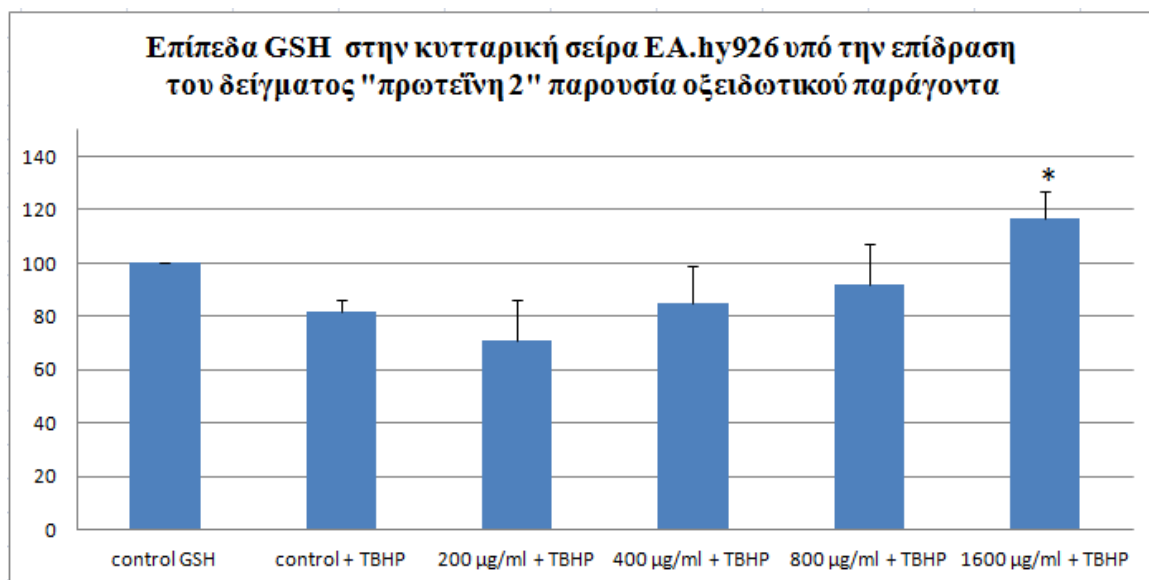
Γράφημα 39: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες.

*Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p < 0,05$)

Παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) τα επίπεδα της γλουταθειόνης μειώθηκαν κατά 18% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που είχε προηγηθεί χορήγηση του δείγματος σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης κατά 43%, σε σχέση με το control t-BHP στη συγκέντρωση 1600 µg/ml (γράφημα 41).



Γράφημα 40: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- παρουσία t-BOOH.

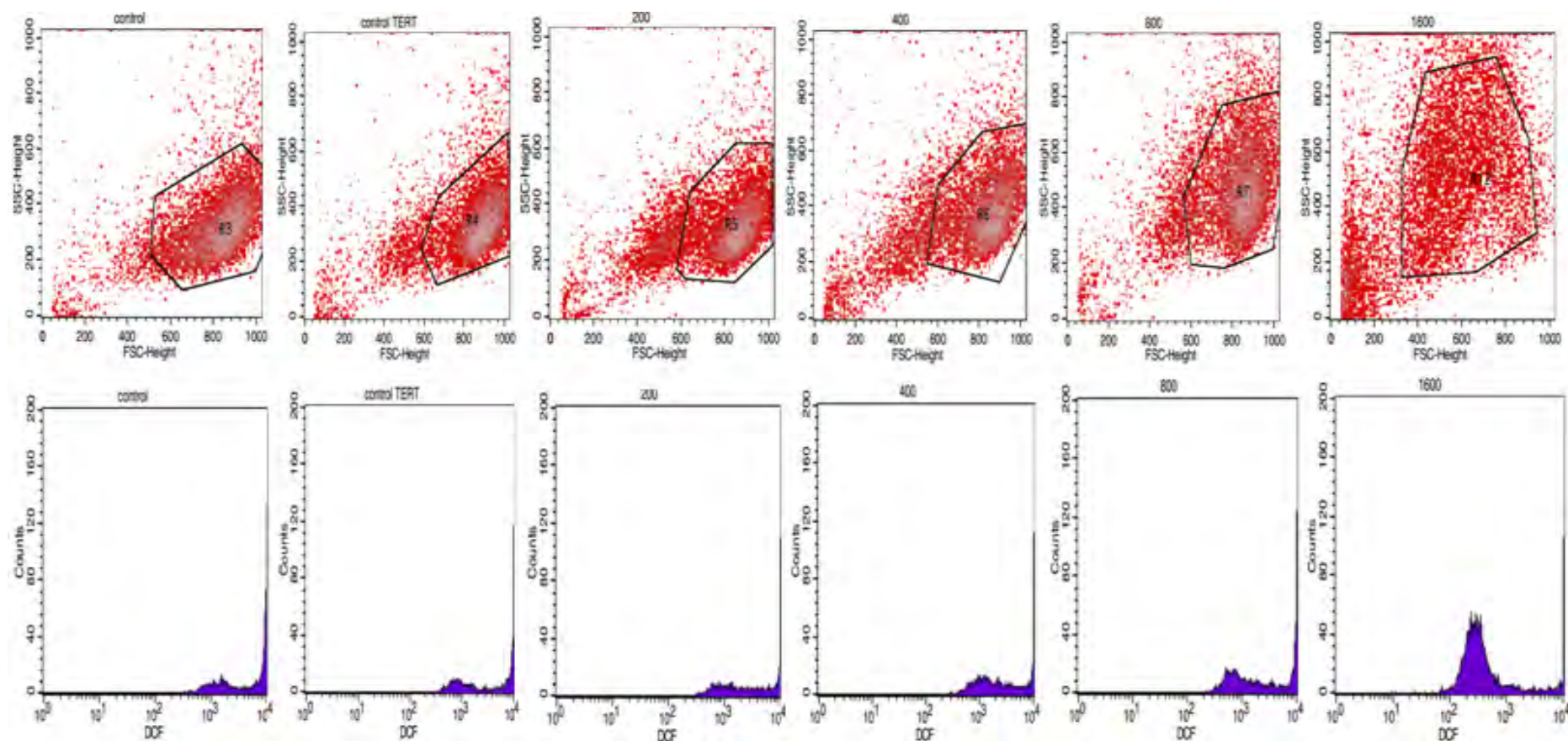


Γράφημα 41: Επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3µM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p < 0,05$)

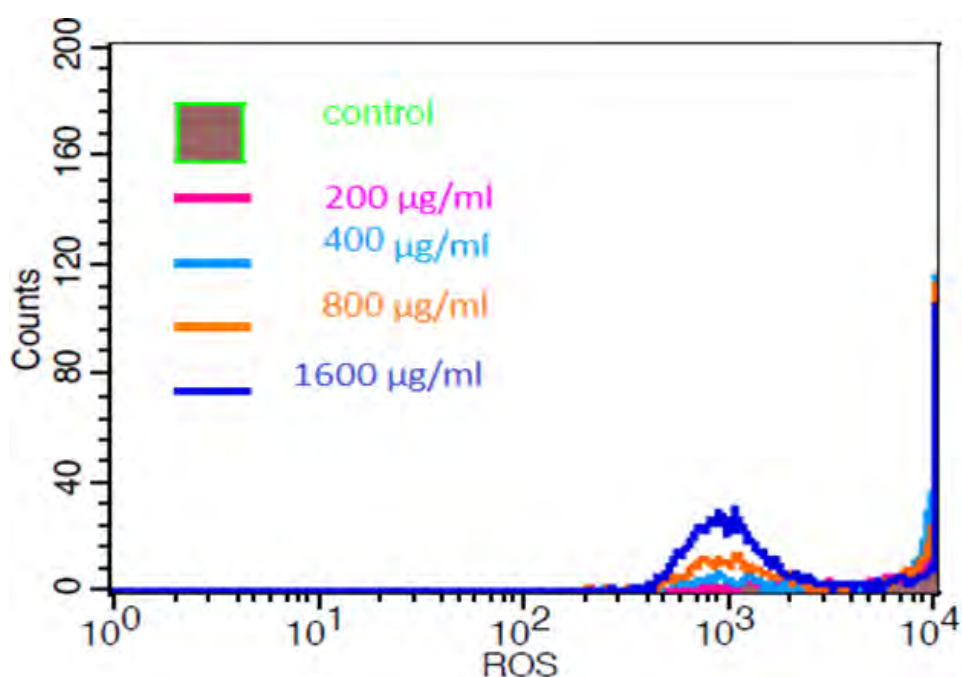
4.6. Αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από επώαση με τα δύο δραστικότερα δείγματα από το σύνολο των δειγμάτων. Στον πρώτο κύκλο πειραμάτων τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με το καθένα από τα δύο δείγματα σε συγκεντρώσεις 1600, 800, 400 και 200 $\mu\text{g/ml}$. Στο δεύτερο κύκλο πειραμάτων μετά την 24ωρη επώαση με το εκάστοτε δείγμα ακολουθούσε επιπλέον 1 ώρα επώαση με τον οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM). Σε αυτόν το δεύτερο κύκλο πειραμάτων προσδιορίστηκε επίσης και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα όταν δεν είχε προηγηθεί προσθήκη κάποιου εκ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Τα πειράματα κάθε κύκλου πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν προκειμένου να έχουμε επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

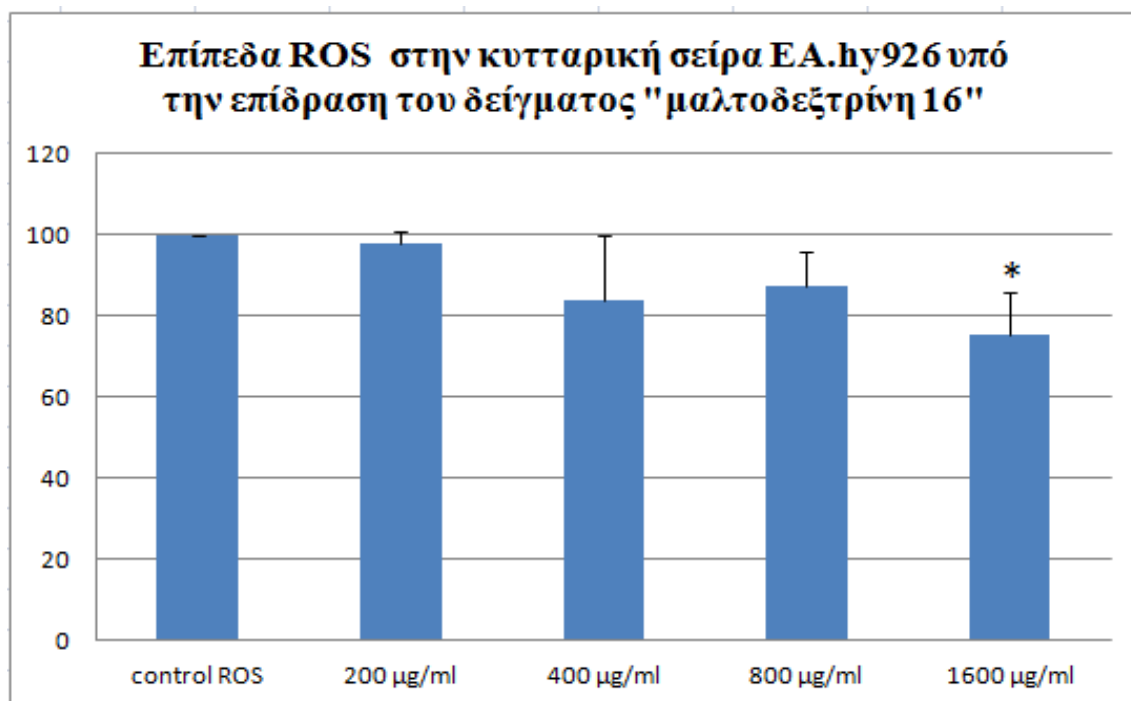
Όσον αφορά το δείγμα «Μαλτοδεξτρίνη 16» τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα των ROS απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρουσίασαν μείωση σε σύγκριση με το control έως και 25% στα 1600 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις 200, 400 και 800 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε μείωση κατά 2%, 16% και 13% αντίστοιχα. (Γράφημα 43).



Εικόνα 24: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων ελευθέρων ριζών (κάτω σειρά) μετά από χρώση με DCFDA υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του *t*-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης του δείγματος «μαλτοδεξτρίνη 16»

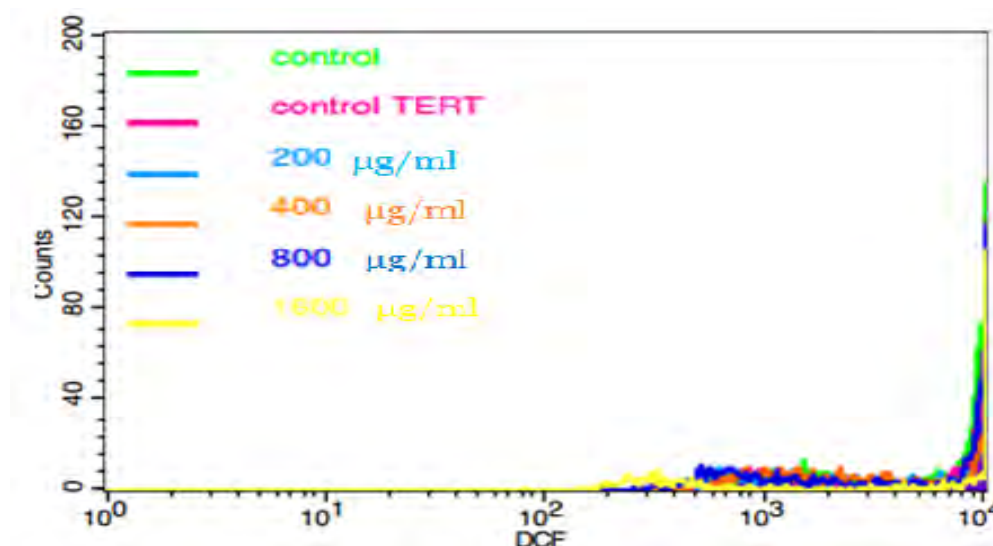


Γράφημα 42: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- Απουσία *t*-BOOH.

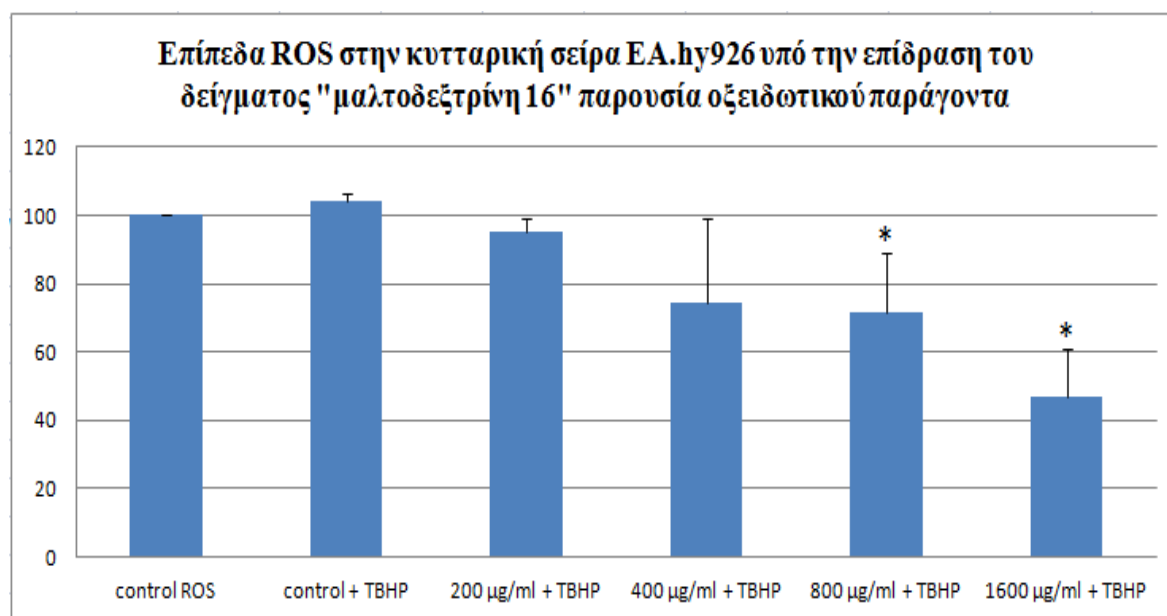


Γράφημα 43: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (*control*) και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το *control* ($p < 0,05$)

Παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών δεν άλλαξαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που είχε προηγηθεί χορήγηση του δείγματος σημειώθηκε μείωση των επιπέδων ROS κατά 9%, 28%, 31% και 55%, σε σχέση με το control t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (γράφημα 45).

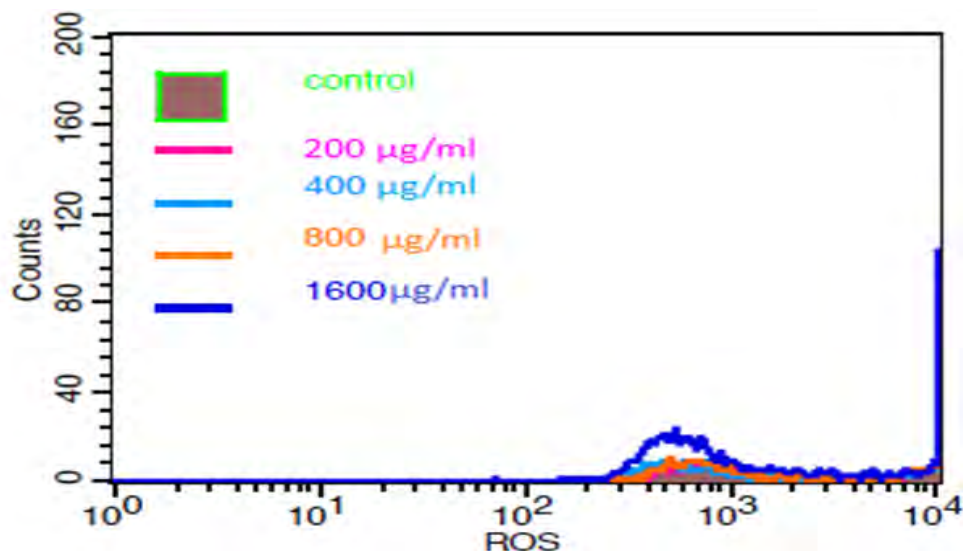


Γράφημα 44: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα μαλτοδεξτρίνης- παρουσία t-BOOH.

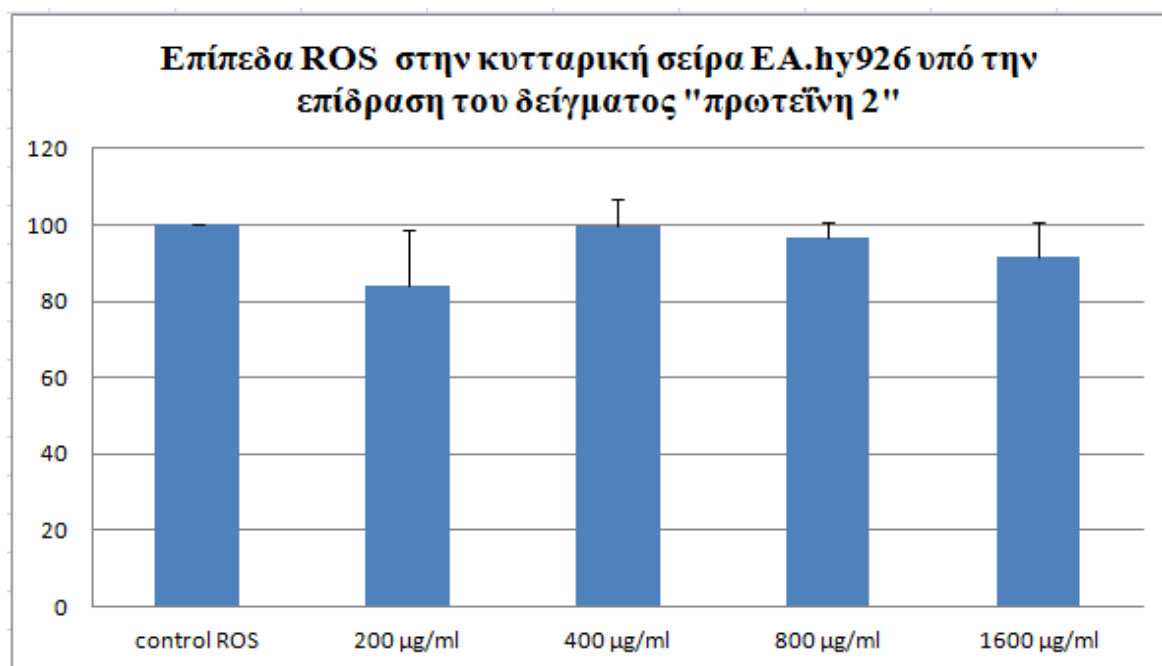


Γράφημα 45: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3 μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 16 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p < 0,05$)

Όσον αφορά το δείγμα «Πρωτεΐνη 2» τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα ROS απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρουσίασαν μείωση σε σύγκριση με το control έως και 16% στα 200 $\mu\text{g/ml}$ αν και όχι στατιστικά σημαντική (γράφημα 47).

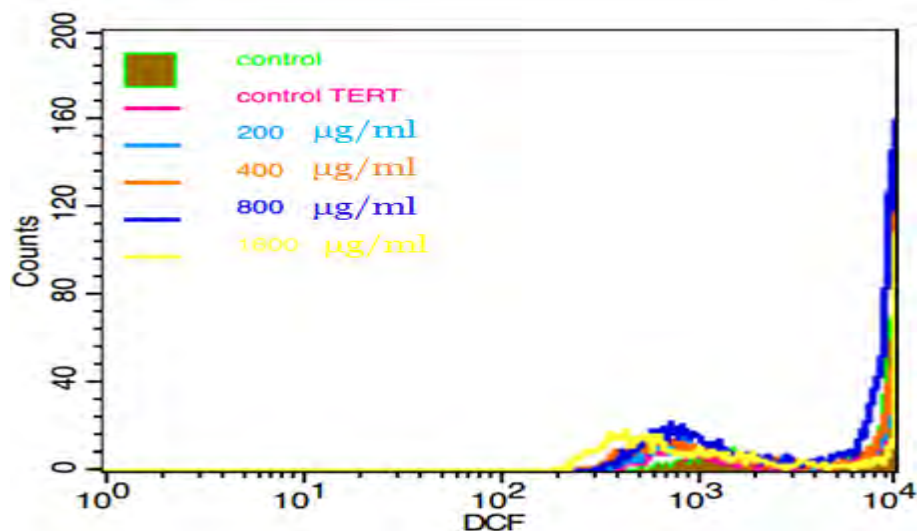


Γράφημα 46: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- Απουσία *t-BOOH*.

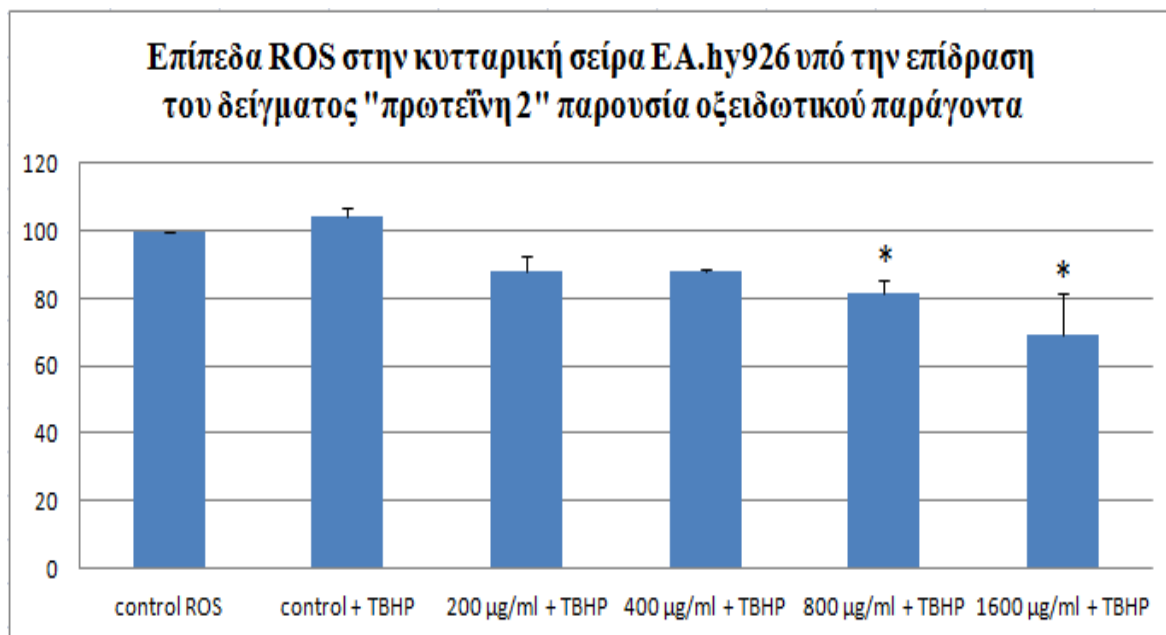


Γράφημα 47: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες.

Παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα, στα δείγματα που είχε προηγηθεί χορήγηση του δείγματος σημειώθηκε μείωση των επιπέδων ROS κατά 15%, 16%, 22% και 34%, σε σχέση με το control t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (γράφημα 49).



Γράφημα 48: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό κυτταρομετρίας ροής. Δείγμα πρωτεΐνης- παρουσία t-BOOH.



Γράφημα 49: Επίπεδα ελευθέρων ριζών στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3 μM) για 1 ώρα και υπό την επίδραση του δείγματος 2 για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control t-BHP ($p < 0,05$)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο είναι το ενδιαφέρον, που παρουσιάζει η παγκόσμια κοινότητα για την παραγωγή ενδιαιτημάτων φυτικής προέλευσης. Η τάση αυτή μπορεί εύκολα να εξηγηθεί εάν ληφθεί υπόψη το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εν λόγω τροφών, το οποίο είναι ευεργετικό για την υγεία, καθώς πληθώρα μελετών έχει συσχετίσει τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες και γενικότερα ενίσχυση της πρόληψης ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress. Έτσι, καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση των λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

Συγκεκριμένα, το ελαιόλαδο είναι ένα από τα φυτικά προϊόντα που έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει συγκεντρώσει μεγάλη μερίδα του ενδιαφέροντος, καθώς έχει αποδειχθεί πως φέρει ένα πλούσιο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ωστόσο, ακόμη και τα απόβλητα που παράγονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών και για το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα έχει πλέον στρέψει το ενδιαφέρον της και σε αυτά. Έτσι δεν επιτυγχάνεται μόνο η μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με την επεξεργασία και την εναλλακτική χρήση των αποβλήτων, αλλά και η ανάκτηση των αντιοξειδωτικών συστατικών τους με σκοπό την εφαρμογή τους στην καθημερινή ζωή, μειώνοντας το οξειδωτικό stress και προλαμβάνοντας τις ασθένειες με τις οποίες αυτό σχετίζεται.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, το οποίο ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Έτσι, ένα πολυφαινολικό εκχύλισμα που απομονώθηκε από τα υγρά απόβλητα ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη υπό 7 διαφορετικές συνθήκες καθώς και σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος υπό 5 διαφορετικές συνθήκες, δίνοντας συνολικά 12 διαφορετικά δείγματα προς έλεγχο.

Για την *in vitro* εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τρεις μέθοδοι.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία εξουδετέρωσης της σταθερής χημικής ρίζας ABTS^{•+} και έπειτα αξιολογήθηκε η προστατευτική δράση των δειγμάτων έναντι της

επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (ROO^\bullet) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Και στις 2 αυτές μεθόδους προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων στην οποία εμφάνιζαν αναστολή-εξουδετέρωση των ριζών που εξετάστηκαν, κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι και η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Όσον αφορά τη μέθοδο του $\text{ABTS}^{+\bullet}$, το σύνολο των 12 δειγμάτων που εξετάστηκε παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση με εύρος τιμών IC_{50} που κυμαίνονται από 219 ± 24 έως 547 ± 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και ισχυρότερο το δείγμα 15 (IC_{50} 219 ± 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$), που ήταν ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη υπό συνθήκες: θερμοκρασία εισαγωγής = 120°C , θερμοκρασία εξαγωγής = 82°C και ρυθμός παροχής = 5%.

Όσον αφορά τη μέθοδο αναστολής των ριζών περοξυλίου (ROO^\bullet) και πάλι τα δείγματα στο σύνολο τους εμφάνισαν προστατευτική δράση με εύρος τιμών IC_{50} που κυμαίνονται από 520 ± 41 έως 2250 ± 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και ισχυρότερο το δείγμα 2 (IC_{50} 520 ± 41 $\mu\text{g}/\text{ml}$), που ήταν ενθυλακωμένο σε πρωτεΐνη υπό συνθήκες: θερμοκρασία εισαγωγής = 180°C , θερμοκρασία εξαγωγής = 97°C και ρυθμός παροχής = 10%.

Όπως αποδεικνύεται από τα IC_{50} και των δυο παραπάνω μεθόδων, τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη παρουσίασαν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη. Ιδιαίτερα μεταξύ των ενθυλακωμένων σε πρωτεΐνη δειγμάτων, τα δείγματα 5 και 3 διαπιστώθηκε πως ήταν αυτά με την ασθενέστερη αντιοξειδωτική δράση.

Στο τελευταίο στάδιο της παρούσας μελέτης, εξετάστηκε η ικανότητα βελτίωσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926), από τα πιο ισχυρά δείγματα μεταξύ μαλτοδεξτρίνης και πρωτεΐνης (16 και 2 αντίστοιχα), αξιολογώντας τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού stress, ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της κυτταρομετρίας ροής επιλέχθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) με τη βοήθεια της μεθόδου XTT. Τα δείγματα 16 και 2 επιλέχθηκαν συνυπολογίζοντας τη δραστηριότητα τους στις δύο προαναφερθείσες μεθόδους και σε ότι αφορά το δείγμα 16 οι συνθήκες ενθυλάκωσής του ήταν: θερμοκρασία εισαγωγής = 100°C , θερμοκρασία εξαγωγής = 57°C και ρυθμός παροχής = 10%.

Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα. Απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH έως και 88% για το δείγμα μαλτοδεξτρίνης και 82% για το δείγμα πρωτεΐνης στη μεγαλύτερή τους

συγκέντρωση σε σύγκριση με το control. Η αύξηση των επιπέδων GSH επιβεβαιώνει ότι το εκχύλισμα παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τα κύτταρα μετά από επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα γλουταθειόνης συγκριτικά με το control. Από την άλλη στα κύτταρα στα οποία είχε προηγηθεί χορήγηση των δειγμάτων μαλτοδεξτρίνης και πρωτεΐνης παρουσιάστηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 104% και 43% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με το t-BHP. Μάλιστα, στην περίπτωση του δείγματος μαλτοδεξτρίνης **τα επίπεδα GSH μπόρεσαν να αυξηθούν περισσότερο παρουσία απ' ότι απουσία του t-BHP**. Αυτή η διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα της γλουταθειόνης, παρουσία και απουσία του οξειδωτικού παράγοντα, ίσως οφείλεται στο γεγονός πως η πρόκληση οξειδωτικού stress από τον οξειδωτικό παράγοντα είναι δυνατό να οδηγεί σε επαγωγή των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της GSH ως φυσική άμυνα/ προστασία των κυττάρων στο stress.

Ακόμη, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών ROS, τόσο παρουσία όσο και απουσία του οξειδωτικού παράγοντα. Απουσία του οξειδωτικού παράγοντα παρουσιάστηκε μείωση σε σύγκριση με το control έως και 25% για το δείγμα μαλτοδεξτρίνης στα 1600 µg/ml και έως 16% στα 200 µg/ml για το δείγμα πρωτεΐνης.

Στα κύτταρα στα οποία είχε προηγηθεί του οξειδωτικού παράγοντα η χορήγηση του εκχυλίσματος παρουσιάστηκαν μειωμένα επίπεδα ROS έως και 55% σε σχέση με το control t-BHP στη συγκέντρωση 1600 µg/ml του δείγματος μαλτοδεξτρίνης και έως και 34% στη ίδια συγκέντρωση του δείγματος πρωτεΐνης. Μάλιστα, και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούμε πως **τα επίπεδα ROS μειώθηκαν περισσότερο παρουσία απ' ότι απουσία του t-BHP**. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το ότι παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα διεγείρονται οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων και έτσι **έχουμε μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών παρουσία, παρά απουσία του t-BOOH**.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το πολυφαινολικό εκχύλισμα από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μετά από ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος διατήρησε ισχυρή την αντιοξειδωτική του δράση. Στο σύνολο των τριών μεθόδων πιο ισχυρά αποδείχτηκαν τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη. Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί πως η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα του, ώστε αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής, βιολειτουργικών τροφίμων ή και ως συντηρητικό.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

➤ Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Σπανού Χρυσούλα., Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών, 2010.
- Χατζηπαυλίδης Ι.Γ, Επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων της ελαιουργίας στη δυναμική και τις δράσεις των μικροβιακών πληθυσμών στο έδαφος, 1999

➤ Ξένη Βιβλιογραφία:

- Adlercreutz H, Mazur W., Phyto-oestrogens and Western diseases, Ann Med. 1997 29:95–120
- Arienzo M, De Martino A, Capasso R, Di Maro A, Parente A., Analysis of carbohydrates and amino acids in vegetable waste waters by ion chromatography., March/April 2003, Phytochemical Analysis Volume 14, Issue 2, pages 74–82
- Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E, Juliano RL, In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins., December 1992, J cell physiol 153(3):437-49.
- Baydar, N. G., Ozkan, G., & Sagdic, O. “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.)”. 2004. Food Chemistry, 15, 335–339.
- Bertelli A, Bertelli A.A, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. Drugs Exp Clin Res., 1998 24:133–138.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L., Rescioa, L. “An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. 2008. Separation and Purification Technology, 64, 192–197.
- Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Botan 91: 179-194.

- Bode AM, Dong Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.*, 45:422–430, 2006.
- Bucic´-Kojic´, A., Planinic´, M., Tomas, S., Bilic´, M., & Velic, D. “Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds”. 2007. *Journal of Food Engineering*, 81, 236–242.
- Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001 Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.
- Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 81:223-9, 2005
- Corrales, M., Fernández García, A., Butz, P., & Tauscher, B. “Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure”. 2009. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421.
- Crozier A, Clifford M.N, Ashihara J. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, 2006
- Dew TP, Day AJ, Morgan MR., 2005. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. *J Agric Food Chem* Aug 10, 53:6510-5.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999, 65(4):337-53.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, “Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress”, *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, 2004.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000 48:3597-3604.
- Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111
- Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989
- Halliwell B, “Free Radicals and other reactive species in Disease”, National University of Singapore, 2001.
- Harborne J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res.* 1986, 213:15-24.

- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Hix S., Kadisiska M.B., Mason R.P., Augusto O., 2000, In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol* 13: 1056-1064.
- Kris Etherton P.M, Hecker K.D, Bonanome A, Coval S.M, Binkoski A.E, Hilpert K.F, Griel A.E, Etherton T.D, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113:S71-88.
- Kumar Ajay, 2009, *Bioseparation Engineering*. I. K. International. p. 179. ISBN 93-8002-608-0
- Lima C.F., 2006, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79, 2056-2068.
- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 1994 54:1895s-1898s.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J. Clin Nutr.* 2004 79:727-747.
- Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S. "Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters", 2007, *Journal of Environmental Management* 84 (2) , pp. 134-140.
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. 1993 A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-12
- Mulinacci N, Romani A, Galardi C, Pinelli P, Giaccherini C, Vincieri FF., Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples., August 2001, *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (8), pp 3509–3514
- Nahar, L., & Sarker, S. D., "Supercritical fluid extraction", 2005, *Natural Products Isolation*, 20, 47–76. Palma & Taylor, 1999
- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.EC., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.AM, (2001), *Flevonoids: a review of probable mechanisms of action and potential* 100ynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25

- Palenzuela, B., Arce, L., Macho, A., Munoz, E., Rios, A., & Valcarcel, M. "Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap". 2004. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 2021–2027.
- Palma, M., & Taylor, L. T. "Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide". 1999. *Journal of Chromatography A*, 849, 117–124.
- Prior R, Xianli W, Schaich K, "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements". 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53 (6) : 1841-1856.
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*. 1989 10:1833-1839
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radicle Biology and Medicine*, 26: 1231–1237, 1999.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005, 45:287-306.
- Scalbert A, 2000, Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols., *The journal of nutrition*, August 1, 2000 vol. 130 no. 8 2073S-2085S
- Shahidi F, Naczki M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.
- Sies H., Summer K.H. 1975 Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur J Biochem* 57: 503-512.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000 80:1073–1080.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. "Phenolic compounds and stability of virgin olive oil". 1992 *Food Chemistry* 45, pp. 141-144.

- Valavanidis A, Scoullos M, Dassenakis M, Vlahogianni T., Pollutant-stimulated reactive oxygen species and oxidative stress biomarkers. Applications in Environmental Toxicology and Ecotoxicology studies of aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:178-189, 2006.
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.